



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

DAVID JOÃO ARINTO MARTINS

HE4 COMO BIOMARCADOR NO CANCRO DO OVÁRIO

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE MEDICINA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIREDO DIAS
DR. RICARDO JOÃO ROQUE

FEVEREIRO/2024

Índice

Abreviaturas	2
Resumo	3
Abstract	4
Introdução	5
Materiais e métodos.....	10
<i>Human epididymis protein 4 (HE4)</i>	11
Fatores de variação do HE4	14
Papel do HE4 na oncogénese do cancro do ovário.....	18
Papel do HE4 no rastreio e diagnóstico precoce de CO	20
Papel do HE4 no prognóstico pré-operatório.....	28
HE4 na monitorização do tratamento do cancro do ovário.....	30
Papel do HE4 na recorrência.....	33
Utilização conjunta do HE4 com CA-125 e algoritmos diagnósticos	35
Conclusão	40
Referências bibliográficas	44

Abreviaturas

Anti-VEGF: *Anti-vascular endothelial growth factor therapy*

AUC: *Area Under the Curve*

CA-125: *Cancer antigen 125*

CEA: *Carcinoembryonic antigen*

CMIA: *Eletroquimioluminescência*

CO: *Cancro do ovário*

DCE-MRI: *Ressonância magnética de contraste dinâmico*

DRC: *Doença Renal Cónica*

ECLIA: *Quimiluminescência*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMT: *Transição epitélio-mesenquimal*

ESGO: *European Society of Gynaecological Oncology*

ESMO: *European Society for Medical Oncology*

FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

HE-4: *Human epididymis protein 4*

HIF1 α : *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*

HTA: *Hipertensão arterial*

IMC: *Índice de massa corporal*

NCNN: *National Comprehensive Cancer Network*

OC: *Ovarian Cancer*

PARP: *Poly (ADP-ribose) polymerases*

PD-L1: *Programmed Cell Death Ligand 1*

PET: *Tomografia de emissão de positrões*

RMI: *Risk of Malignancy Index*

ROMA: *Risk of Malignancy Algorithm*

SG: *Sobrevida global*

SLP: *Sobrevida livre de progressão*

sROC: *Summary receiver operating characteristics*

TC-TAP: *Tomografia Computorizada toracoabdominopélvica*

VEGF: *Endothelial Growth Factor*

VPN: *Valor Preditivo Negativo*

VPP: *Valor Preditivo Positivo*

WFDC: *Whey Acidic four-disulfide core*

WHO: *World Health Organization*

Resumo

A falta de estratégias eficazes de diagnóstico precoce, definição prognóstica e seguimento das doentes, torna o cancro do ovário a neoplasia ginecológica com maior taxa de mortalidade. Os biomarcadores tumorais séricos são dos recursos com maior potencial para colmatar alguns destes problemas, todavia, nas recomendações atuais das diversas sociedades internacionais, o CA-125 continua a ser o biomarcador de eleição, apesar das suas diversas fragilidades, como uma fraca capacidade de diagnóstico em estádios precoces. O Human epididymis protein 4 (HE4) é uma glicoproteína que pode ser utilizada como biomarcador no cancro do ovário, devido à sua produção pelas células malignas e respetivo microambiente tumoral. No entanto, as suas concentrações variam de acordo com diversos fatores fisiológicos e patológicos, dificultando a sua aplicabilidade clínica.

O doseamento de HE4 no soro, mas também na urina, pode contribuir para um diagnóstico pré-clínico da doença, com sensibilidade e especificidade elevadas, permitindo diagnósticos em estádios mais precoces do cancro do ovário, com um impacto direto na sobrevida. Adicionalmente, as suas concentrações pré-operatórias permitem estratificar os doentes em níveis de risco, auxiliando na decisão da terapêutica cirúrgica e médica, uma vez que podem ser também preditivas acerca da sensibilidade à terapêutica sistémica. O doseamento seriado de HE4 no decurso da doença permite uma monitorização contínua do tratamento instituído e avaliação de reposta. Do mesmo modo, atendendo à elevada taxa de recorrência do cancro do ovário, este pode detetar recidivas de forma precoce e permitir uma abordagem terapêutica mais atempada e, possivelmente, com melhor prognóstico.

Apesar da utilidade do HE4 de forma isolada, a sua associação com o CA-125 demonstra ser frequentemente vantajosa nas variadas utilizações. Estes marcadores são também utilizados em algoritmos diagnósticos, que avaliam o risco de uma mulher com massa pélvica ter cancro do ovário.

Assim, esta revisão pretende explorar o papel do HE4 enquanto biomarcador no cancro do ovário, e os seus possíveis contributos para a melhoria do atual paradigma desta doença, tanto de forma independente quanto em associação com o CA-125, nas diversas fases da doença: abrangendo o diagnóstico precoce, prognóstico pré-operatório, monitorização terapêutica e ainda seguimento das doentes. Adicionalmente, explora o potencial da substância como alvo terapêutico, associado ao seu papel na oncogénese do cancro do ovário.

Palavras-chave: *Human epididymis protein 4*; cancro do ovário; biomarcadores; diagnóstico; prognóstico; seguimento

Abstract

Due to the lack of effective strategies for early diagnosis, prognosis and patient follow-up, ovarian cancer is the gynecological neoplasm with the highest mortality rate. Serum tumor biomarkers are one of the resources with the greatest potential to overcome some of these problems, however, in the current recommendations of the various international societies, CA-125 remains the biomarker of choice, despite its various pitfalls, such as poor diagnostic capacity at early stages. Human epididymis protein 4 (HE4) is a glycoprotein that can be used as a biomarker in ovarian cancer, due to its production by malignant cells and the tumor microenvironment. However, its concentrations vary with numerous physiological and pathological factors, making it difficult to translate to the clinical setting.

HE4 concentrations in serum, but also in urine, can contribute to the pre-clinical diagnosis of the disease, with high sensitivity and specificity, allowing diagnosis at earlier stages of ovarian cancer, with a direct impact on survival. In addition, preoperative concentrations allow for the stratification of patients into risk levels, aiding clinicians to decide on surgical and medical therapy, since they can also be predictive of sensitivity to systemic treatment. Longitudinal dosing of HE4 during the course of the disease allows continuous monitoring of treatment and evaluation of response. Likewise, given the high recurrence rate of ovarian cancer, it can help to detect recurrences earlier and allow for a more timely therapeutic approach, possibly with a better prognosis.

Despite the usefulness of HE4 on its own, its association with CA-125 often proves to be advantageous in various settings. These markers are also used together in diagnostic algorithms that assess the risk of ovarian cancer in a woman with a pelvic mass.

Therefore, this review aims to explore the role of HE4 as a biomarker in ovarian cancer, and its possible contributions to improving the current paradigm of this disease, both independently and in association with CA-125, in the various stages of OC: covering early diagnosis, preoperative prognosis, therapeutic monitoring and patient follow-up. In addition, it explores the potential applicability of HE4 as a therapeutic target, regarding its role in the oncogenesis of ovarian cancer.

Keywords: Human epididymis protein 4; ovarian cancer; biomarkers; diagnosis; prognosis; follow-up

Introdução

O cancro do ovário (CO) é o oitavo cancro mais comum a nível mundial e o quinto com maior mortalidade na população feminina. Estima-se que tenha uma incidência de 3,4% associada a uma mortalidade de 4,7% (1). No que diz respeito a neoplasias ginecológicas, esta é a mais mortal, tendo causado mais de 200 mil mortes em 2020 (1). As mulheres pós-menopausa apresentam um maior risco de desenvolver cancro do ovário, e a probabilidade de ter doença em estágio avançado aumenta com a idade. A prevalência desta doença neste grupo específico de mulheres é de 1 a cada 2500, sendo que cerca de 80 por cento dos casos de cancro do ovário são diagnosticados em mulheres com mais de 50 anos (2). Mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, síndrome de Lynch e síndrome de Li-Fraumeni, têm risco aumentado de desenvolver a doença (3).

Cerca de 20% dos casos de cancro do ovário têm uma causa ambiental, estando relacionados com o álcool, obesidade, tabagismo, uso de talco e dieta. Outros fatores, tais como a infeção por *Chlamydia trachomatis*, e a presença de níveis baixos de vitamina D associam-se também a maior risco de desenvolver CO (4). Por outro lado, multiparidade, laqueação tubar e o uso de contraceptivos orais são fatores protetores para o desenvolvimento de cancro do ovário (5).

O CO é classificado histopatologicamente em tumores epiteliais e não epiteliais. Os primeiros representam cerca de 90% dos casos. Segundo a classificação da WHO (*World Health Organization*) estes podem ainda ser categorizados em serosos de alto grau (70%), serosos de baixo grau (5%), endometrioides (10%), mucinosos (3-4%), de células claras (6-10%), seromucinosos e de Brenner. Dependendo de várias características, entre elas a presença de atipia celular, a invasão do estroma, e a extensão da proliferação de células tumorais, estes podem ainda ser categorizados como benignos, borderline ou malignos (6,7). Os não epiteliais, mais associados a mulheres jovens, podem dividir-se em vários grupos, existindo três mais relevantes: os tumores da linha germinativa, que englobam disgerminomas, teratomas e tumores do saco vitelino; os tumores dos cordões sexuais e estroma, que se subdividem em tumores da granulosa e tumores das células de Sertolli/Leydig; e ainda os tumores mesenquimatosos (6,7). O subtipo mais comum (75% dos casos) e também o mais mortal de CO é o carcinoma seroso de alto grau (3).

Apesar da importância do diagnóstico precoce, não existe nenhum rastreio de base populacional, isto é, nas mulheres sem risco aumentado de desenvolver cancro do ovário (8). Num estudo de larga escala tentou-se estabelecer uma potencial estratégia de rastreio com o uso conjunto do CA-125 e da ecografia transvaginal, mas estes não evidenciaram suficiente especificidade ou sensibilidade para serem considerados eficazes no rastreio de cancro do ovário na população geral, não permitindo um diagnóstico significativamente mais precoce da doença e, conseqüentemente, não causando uma diminuição da mortalidade (9). Assim, um dos maiores objetivos dos estudos atuais nesta doença é definir um método de rastreio válido que permita detetar o cancro do ovário em estádios precoces (10).

O diagnóstico é feito na maioria dos casos quando existe sintomatologia que leve as doentes a recorrerem aos serviços de saúde. O CO, em estádios iniciais, é assintomático ou apresenta-se de forma bastante inespecífica, com sintomas comumente encontrados em mulheres saudáveis, tais como dor abdominal inespecífica, dificultando o seu diagnóstico precoce (11). No que diz respeito a estádios avançados, 90% das mulheres apresentam ascite maligna causada por carcinomatose peritoneal. Isto acontece devido ao padrão de disseminação intra-abdominal e ganglionar retroperitoneal, que caracteriza o CO nestes estádios (3).

Em mulheres que através de uma história clínica detalhada e de achados ao exame físico se suspeite de cancro do ovário, deve ser realizada uma ecografia transvaginal. Este exame permite identificar a presença de massas anexiais e através das características ecográficas das mesmas, como a vascularização, pode ser possível inferir acerca da potencial malignidade do CO. Contudo, a precisão diagnóstica desta técnica ainda necessita de ser otimizada, visto que em 25% dos casos de CO o diagnóstico ecográfico é inconclusivo (12). Este diagnóstico diferencial entre benignidade e malignidade é importante, pois uma larga percentagem de tumores do ovário são benignos. Cerca de 90% dos tumores benignos são encontrados em mulheres pré-menopausa. Todavia, apesar de mais frequentes neste grupo, verifica-se que nas mulheres pós-menopausa também 60% dos tumores do ovário são benignos. Desta forma, é importante criar métodos de diagnóstico que permitam diferenciar com qualidade uma massa benigna de uma massa maligna, de modo a planear a abordagem subsequente da forma mais correta. Isto ganha ainda maior relevância, quando se equaciona uma estratégia cirúrgica, cujos riscos são mais elevados numa população idosa (13). De forma rotineira, em conjunto com a ecografia, faz-se o doseamento do CA-125, que apesar da sua elevada falibilidade no diagnóstico, é amplamente utilizado

pois é uma forma não invasiva e económica de contribuir para o estudo diagnóstico de CO.

Atualmente o *gold standard* para o diagnóstico definitivo de cancro do ovário assenta na avaliação histológica da massa através de biopsias, seja com recurso a laparotomia exploradora com estudo extemporâneo seguido de cirurgia, para casos suspeitos de um CO em estágio inicial, ou através biopsias laparoscópicas em caso de doença irressecável. Como o tratamento preconizado para massas benignas e massas malignas é completamente diferente, existe a necessidade de uma boa caracterização histológica pré-cirúrgica, particularmente quando a malignidade é dúbia. Assim, entende-se que o diagnóstico final requer procedimentos invasivos, que acarretam riscos e morbidade para as doentes (14).

Para o estadiamento clínico e planeamento cirúrgico utiliza-se a tomografia computadorizada toracoabdominopélvica (TC-TAP), podendo ser complementado o estudo por ressonância magnética ou por tomografia de emissão de positrões (PET) (15). O estadiamento definitivo do cancro do ovário é cirúrgico, através de laparoscopia exploradora, sendo feito atualmente utilizando a classificação FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) de 2014 (15).

O estágio da doença no momento do diagnóstico é de extrema importância, pois impacta substancialmente o prognóstico. Quando o CO é detetado em estágio precoce (FIGO I), confinado ao ovário, ou até em FIGO II, com alastramento ao peritoneu pélvico, a sobrevivência aos 5 anos é elevada, sendo de 90% e 70% respetivamente. Deste modo, uma deteção em estágio inicial, corresponde a uma elevada probabilidade de cura (2). No entanto a rápida progressão desta doença, com tendência em atingir um estágio avançado em menos de um ano, associado à falta de um método de deteção precoce eficiente, faz com que cerca de 70 % dos casos sejam diagnosticados tardiamente (apenas 25 % são diagnosticados em estágio I) e, conseqüentemente, menos de 40% das doentes sejam curadas (13).

No que diz respeito ao tratamento, este depende do estágio em que a doença é diagnosticada. Para estágios precoces (I-II de FIGO) o tratamento preconizado é cirurgia primária de citorredução máxima, de modo a obter uma ressecção R0. De seguida, em doentes que apesar de estágio precoce e ressecção R0 são classificados como de alto risco, está indicado tratamento adjuvante com sais de platina, de modo a diminuir o risco de recidiva. Em estágios avançados (III-IV de FIGO) a decisão depende

não só do estadiamento, mas também da probabilidade de se realizar uma excisão completa da doença. Caso seja expectável uma remoção completa, o tratamento indicado é uma cirurgia seguida de quimioterapia adjuvante. Caso contrário, está indicado realizar tratamento sistémico neoadjuvante com sais de platina e, de seguida, caso exista redução do volume tumoral e critérios de ressecabilidade, avançar para uma cirurgia de intervalo, muitas vezes seguida ainda de tratamento adjuvante (16,17). Para além destes, em algumas doentes, pode utilizar-se atualmente terapêuticas sistémicas dirigidas como anticorpos anti fator de crescimento do endotélio vascular (anti-VEGF) e inibidores das *poly (ADP-ribose) polymerases* (iPARP) (18).

Um dos maiores desafios na abordagem terapêutica do CO assenta no seu elevado risco de recorrência, que ocorre em 75% dos casos de doentes com neoplasias em estágio avançado tratadas com cirurgia e quimioterapia (7). O seguimento rigoroso e apertado das doentes é, assim, importantíssimo para deteção precoce de recidivas. No entanto, esta é uma tarefa de extrema dificuldade, visto que após a cirurgia não existe nenhuma forma de avaliar a doença residual microscópica e a recidiva frequentemente manifesta-se com lesões disseminadas de pequeno volume, que os exames de imagem são limitados a detetar precocemente. A única forma atualmente reconhecida de o fazer é através do doseamento de biomarcadores que se elevem de forma precoce quando exista recorrência, nomeadamente o CA-125 (19).

Os biomarcadores são substâncias produzidas por células tumorais ou por células do microambiente tumoral, que podem ser quantificadas no sangue e outros fluidos biológicos (20). Os biomarcadores, particularmente os séricos, são, assim, um recurso muito importante no CO, pela sua grande conveniência, serem não invasivos e ainda pelo seu baixo custo, permitindo-nos tirar inúmeras conclusões nas mais diversas fases da doença. Estes podem ser úteis para colmatar a necessidade imperativa de detetar a doença em estádios precoces, podendo contribuir para rastreio e diagnóstico do CO, e conseqüente ter um impacto direto na mortalidade. Para além disso, podem ser utilizados no prognóstico pré-operatório da doença, permitindo estratificar doentes em níveis de risco, e ainda ajudar a decidir qual a melhor abordagem terapêutica individualmente. Através do doseamento destas substâncias, pode-se ainda monitorizar a resposta aos diversos tratamentos instituídos, como também detetar precocemente recorrências, muito tempo antes de existirem manifestações clínicas. Por fim, visto que várias destas substâncias estão relacionadas com a oncogénese do CO, eventualmente poderão ser utilizadas como potenciais alvos terapêuticos (21,22).

O CA-125, descoberto no início dos anos 80, é o mais estudado dos biomarcadores do CO, constando em grande parte das diretrizes clínicas (23). Cerca de 80% dos CO em estágio avançado (III e IV da FIGO 2014) apresentam níveis elevados deste marcador ao diagnóstico. Apesar de ser o biomarcador com maior utilidade clínica conhecida no cancro do ovário, apresenta várias limitações, entre elas a fraca sensibilidade (50-62%) em estádios iniciais da doença, apresentando-se elevado apenas em 50% de neoplasias nesta fase; bem como uma especificidade aquém do ideal (entre 73-77%), podendo ser influenciado por várias condições fisiológicas ou patológicas, como a menstruação, gravidez e endometriose. Mais de 60% dos indivíduos com CA-125 aumentado não têm diagnóstico cancro do ovário (24). No que diz respeito à monitorização do tratamento, a normalização do CA-125 frequentemente não está associada à ausência completa de tumor, e a sua elevação em caso recorrência, apesar de ser mais precoce que o aparecimento de manifestações clínicas, continua a ser demasiado tardia para a instituição de terapêutica que altere o curso da doença (25). Adicionalmente, o CA-125 varia dependendo do tipo de tumor, com baixa aplicabilidade em tumores não epiteliais e epiteliais de células claras ou mucinosos (26).

Estas limitações que o biomarcador mais utilizado no cancro do ovário apresenta nas diversas fases da doença, justifica o estudo de novas substâncias que possam aproveitar ao máximo todo o potencial do doseamento de biomarcadores tumorais séricos. Uma dessas substâncias e que despertou maior interesse e debate é o HE4. Deste modo, esta revisão narrativa pretende explicar o papel do HE4 como biomarcador tumoral sérico no cancro do ovário, explorando a sua utilidade nas mais diversas fases da doença. Tem como objetivo, portanto, demonstrar como o HE4, de forma isolada ou em conjunto com outros biomarcadores, nomeadamente o CA-125, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na abordagem diagnóstica, determinação do prognóstico, monitorização e seguimento do cancro do ovário e, eventualmente, demonstrar o seu potencial valor na otimização dos resultados clínicos e da qualidade de vida das doentes afetadas por esta patologia.

Materiais e métodos

Para a elaboração desta revisão narrativa, foi realizada uma pesquisa na base de dados eletrónica PubMed®, utilizando a seguinte equação de pesquisa:

((ovarian neoplasms[MeSH Terms]) AND (biomarkers[MeSH Terms])) AND ((WFDC2 protein, human[Supplementary Concept]) OR (HE4[Title/Abstract])).

Através desta pesquisa foram selecionados os artigos de revisão e investigação, em língua inglesa, publicados entre os anos 2018 e 2023, obtendo-se um total de 188 artigos, dos quais foram analisados os *abstracts* e selecionados os mais relevantes para esta revisão. Foram também analisadas as referências bibliográficas mais relevantes dos artigos incluídos, tendo sido citada a informação dos mesmos, quando relevante para este trabalho. Em acréscimo, foram ainda consultadas normas de orientação clínica das principais sociedades científicas da área da ginecologia oncológica, nomeadamente *European Society for Medical Oncology* (ESMO), *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), *European Society of Gynaecological Oncology* (ESGO) e *International Federation of Gynaecology and Obstetrics* (FIGO) perfazendo as 113 referências citadas.

Human epididymis protein 4 (HE4)

A primeira publicação acerca do possível uso do HE4 como biomarcador no cancro do ovário data de 2003, por Hellstrom et al. (27). *Human epididymis protein 4 (HE4)* faz parte da família de proteínas *whey acidic four-disulfide core (WFDC)*, e é expressa pelo gene *WFCD2* localizado no cromossoma 20q12-13.1. Inicialmente foi identificada no epitélio do epidídimo distal, sendo ainda pouco claro o seu papel na maturação espermiática. É uma glicoproteína inibidora de serino-protéases e está também associada à resposta imunitária de tecidos epiteliais, contribuindo para a imunidade inata da cavidade oral e do trato respiratório (28). A normal expressão de HE4 acontece fisiologicamente no epitélio glandular do aparelho genital feminino, com exceção do epitélio de superfície ovárico, no epidídimo e canal deferente, no epitélio respiratório, nos túbulos renais distais, e nas glândulas salivares.

Além do CO, o HE4 também está relacionado com cancro do endométrio e do pulmão. No que diz respeito às neoplasias do endométrio é considerado um dos biomarcadores mais promissores nesta doença, permitindo realizar, com bastante qualidade, um diagnóstico precoce, definição prognóstica, monitorização terapêutica e deteção de recorrência (29). Relativamente ao cancro do pulmão o HE4 pode ser útil tanto no diagnóstico, devido à sua elevação em diversos tipos de neoplasias do parênquima pulmonar, como no prognóstico, e ainda na monitorização de uma possível recorrência (30,31). Para além destes, com menor importância, o HE4 pode ainda estar elevado em casos de outros carcinomas de células escamosas, mesoteliomas e carcinomas da mama (21).

Apesar do HE4 não estar presente no epitélio ovárico normal, este é expresso no tecido neoplásico do cancro do ovário, sendo libertado para a corrente sanguínea e, consequentemente, para a urina, permitindo a sua deteção nestes fluidos biológicos (32). A expressão aumentada de HE4 é observada em 93-100% dos carcinomas do subtipo seroso, em 80-100% dos endometrioides e 50-83% dos carcinomas de células claras, estando maioritariamente ausente no subtipo mucinoso e de células germinativas. Assim, apesar de não estar elevado em todos os tipos de neoplasia ovárica, este está aumentado nos tipos histológicos mais frequentes, sendo então útil na maioria das doentes com CO (33).

No que diz respeito à detecção e doseamento do HE4 existem várias técnicas possíveis, entre elas o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), quimiluminescência (ECLIA) e eletroquimioluminescência (CMIA). O ELISA apresenta várias desvantagens em relação às outras técnicas, visto que exige maior consumo de tempo, é dependente do operador, e em geral apresentar uma menor sensibilidade e precisão. Ao analisar os diferentes métodos de doseamento, um estudo verificou que o valor médio da concentração de HE4 variava consoante o método utilizado (34). Assim, visto que não existe nenhum método universal de doseamento, é recomendável que os valores de HE4 sejam sempre interpretados utilizando o mesmo método longitudinalmente.

A variabilidade metodológica constitui também uma dificuldade na definição de pontos de corte universais, pois, além das discrepâncias entre métodos de doseamento e fabricantes, os diferentes objetivos clínicos da interpretação do biomarcador (diagnóstico, prognóstico, monitorização, entre outros) também requerem diferentes valores de referência (35). Em geral, os pontos de corte a partir dos quais se considera o doseamento positivo, são 70 pmol/L para as mulheres pré-menopausa e 140 pmol/L nas pós-menopausa. A existência de dois valores distintos é devida ao aumento dos níveis de HE4 com a idade e com a menopausa (36).

Um estudo muito recente, explorou o papel de biossensores eletroquímicos no doseamento do HE4. Estes biossensores, são um *point of care test*, ou seja, podem ser realizados em qualquer lugar, perto do local de observação do doente, sem necessidade de recurso a um laboratório. Consistem em elétrodos reutilizáveis e posteriormente descartáveis, permitindo cerca de nove utilizações por elétrodo (no caso deste estudo). O sinal eletroquímico resultante da interação antigénio-anticorpo é medido num dispositivo portátil que permite obter um valor da concentração de HE4 em cerca de 20-30 segundos. Estes biossensores constituem um método com sensibilidade e reprodutibilidade elevadas. Além do mais, são *label free*, ou seja, não requerem a adição de substâncias marcadoras (como no ELISA), sendo o doseamento efetuado de forma direta, e assim, mais rápido e eficiente (36–38).

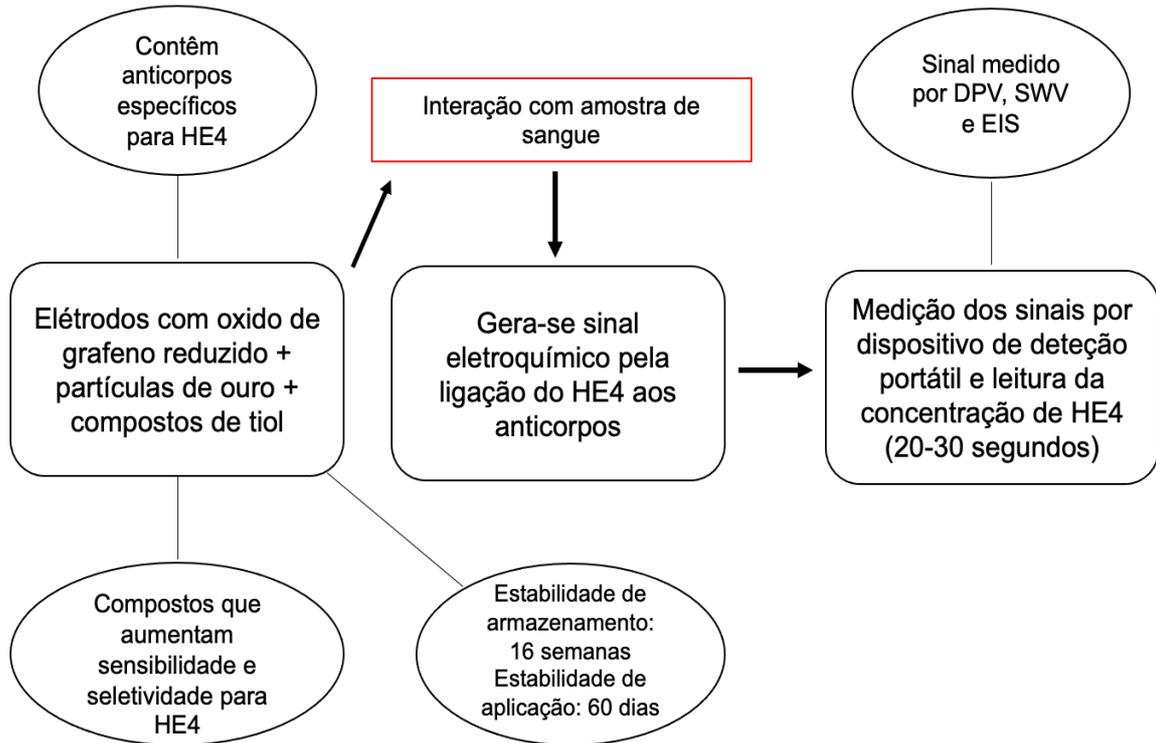


Figura 1: Composição e características dos biossensores eletroquímicos para doseamento do HE4 (36). Legenda: DPV - *differential pulse voltammetry*; SWV - *square wave voltammetry*; EIS - *electrochemical impedance spectroscopy*

Fatores de variação do HE4

O HE4 apesar de ser muito útil no contexto do CO, também é influenciado por diversos outros fatores, sejam eles patológicos ou fisiológicos. (39) No que diz respeito a patologias ováricas benignas, este eleva-se em poucas situações, conferindo uma maior especificidade, e tornando-se vantajoso para distinguir os tumores benignos dos malignos. No que diz respeito a doentes com endometriose, o HE4 é considerado um melhor marcador para diagnosticar cancro do ovário, pois raramente está elevado na endometriose (3% dos casos), ao contrário do CA-125, que se eleva de forma considerável (67% dos casos), diminuindo a sua especificidade e capacidade de discriminar as duas patologias. Assim, o HE4 pode ser um bom marcador para o diagnóstico diferencial entre CO e endometriomas, pois no caso deste último as doentes apresentam muitas vezes o CA-125 aumentado e o HE4 normal. Contrariamente, na adenomiose, o HE4 poderá estar elevado, sendo um fator a ter em conta aquando da sua interpretação (40).

Globalmente, as concentrações de HE4 apresentam uma menor elevação que as do CA-125 em outras patologias benignas como quistos serosos, teratomas, fibromas e lesões inflamatórias. No entanto, os dois marcadores não apresentam diferença significativa entre si no que diz respeito a quistos mucinosos, pois ambos se apresentam elevados (33). Devido a esta baixa capacidade discriminativa do doseamento do CA-125, que advém de uma especificidade aquém do ideal, uma grande percentagem das mulheres que apresentam um aumento deste marcador, não tem cancro do ovário. Assim, o doseamento do CA-125 leva frequentemente a investigações diagnósticas desnecessárias, muitas das vezes invasivas, causando transtornos físicos e emocionais às doentes, e acarretando, por vezes, riscos de morbimortalidade e um elevado consumo de recursos (41). No entanto, numa amostra de mulheres saudáveis verificou-se que o HE4 estava aumentado de forma isolada em 22% dos casos. Isto deve-se ao facto dos níveis de HE4 serem influenciados por outros fatores, abordados adiante (41).

Os valores detetados de HE4 variam consoante a idade e o estado de pré ou pós-menopausa, conforme previamente mencionado e de acordo com o ilustrado na tabela 1. O HE4 aumenta consideravelmente com a idade, sendo que mulheres com mais de 55 anos apresentam concentrações de HE4 maiores que mulheres mais jovens, levando conseqüentemente a uma menor especificidade em idades mais avançadas (39). A idade começa a constituir um fator de variação mais relevante nas mulheres pós-

menopausa, visto que neste grupo o valor de HE4 entre as diferentes faixas etárias varia mais comparativamente com o grupo pré-menopausa, em que a variação é mínima. Este aumento fisiológico do marcador leva a necessidade da adaptação dos valores referência do mesmo para as faixas etárias mais avançadas, de modo a evitar resultados falsos positivos (39,42).

No que diz respeito à influência da menopausa isoladamente, isto é, sem o fator idade, este biomarcador encontra-se mais aumentado nas mulheres pós-menopáusicas. Isto conclui-se devido à existência de diferença significativa entre os níveis de HE4 em mulheres da mesma faixa etária, mas com diferente estado de menopausa (39,42). Relativamente a estes fatores de variação, o CA-125 é apenas influenciado pelo *status* hormonal, sendo maior nas mulheres em pós-menopausa, não sofrendo alterações significativas com a idade (42,43) .

	Pré menopausa			Pós-menopausa			
Idade (anos)	<30	30-39	>40	>60	60-69	70-79	>80
Mediana (pmol/L)	46,2	42,5	50,5	50,7	59,9	66,9	113,4

Tabela 1. Variação da concentração sérica de HE4 nas mulheres pré e pós-menopausa. Adaptado de Richard G. Moore et al. (2012) (44).

A utilidade do HE4 parece ainda ser superior ao CA-125 nas mulheres pré-menopausa, pois este último varia em casos de gravidez e, também, com o ciclo menstrual, diminuindo a sua especificidade em mulheres em idade fértil (8). Os valores de HE4 alteram-se muito pouco com a gravidez, podendo eventualmente ser importante para o estudo de massas anexiais durante esse período. No entanto, não há resultados clínicos conclusivos neste âmbito para justificar a sua aplicabilidade (33). Do mesmo modo, a relação do HE4 com o ciclo menstrual não é ainda clara. Existem estudos que descrevem uma concentração menor do HE4 na fase folicular comparativamente com a fase ovárica, enquanto outros mostraram não existir qualquer diferença de concentrações do marcador entre as diferentes fases do ciclo menstrual (30).

Um fator com muita influência nas concentrações de HE4 é a função renal. Verificou-se que os valores deste biomarcador aumentavam consideravelmente com a deterioração da função renal, apresentando concentrações proporcionais à diminuição da taxa de filtração glomerular. Adicionalmente, estudos indicam que a produção de HE4 está associada à fibrose renal, sendo utilizado como um indicador para a mesma. Evidentemente, no âmbito do CO, o declínio da taxa de filtração glomerular constitui um fator confundidor na interpretação dos valores de HE4. Comparativamente, o CA-125 é menos influenciado pela função renal, apresentando apenas um ligeiro aumento em casos de DRC (doença renal crónica) avançada (31,45,46). Para contornar esta influência pode associar-se doseamentos de Cistatina C aos do HE4. O aumento deste marcador de função renal acompanha-se de um aumento da concentração de HE4, permitindo discriminar patologia neoplásica ovárica de patologia renal (45). Assim, Chovanec et al. propôs a utilização da seguinte equação para permitir fazer uma avaliação mais fidedigna do valor do biomarcador, em que o nível de HE4 é ajustado consoante a taxa de filtração glomerular calculada com a fórmula CKD-EPI: $HE4_{ren} = \exp[\ln(HE4) + 2.182 \times (eGFR-90) \times 10^{-2}]$. HE4_{ren} representa o nível de HE4 ajustado para doentes com taxa de filtração glomerular diminuída (47).

Ao contrário do CA-125, verificou-se que mulheres sob terapêutica com contraceptivos orais apresentavam valores de HE4 menores que utilizadoras de outro tipo de contraceção. Deste modo, a interpretação dos valores deste biomarcador deve ser cuidadosa nestas mulheres (48). No que diz respeito à terapia hormonal da menopausa, a sua relação com o HE4 não é clara (49).

Fatores de risco cardiovasculares também influenciam os doseamentos dos biomarcadores. Um estudo verificou que mulheres com diabetes e hipertensão (HTA) apresentavam níveis de CA-125 menores, o que levava à existência de falsos negativos. Por outro lado, estes dois fatores não têm qualquer tipo de influência nos níveis de HE4 (50). Adicionalmente, apesar da evidência ser algo controversa, o índice de massa corporal (IMC) aparenta não ter influência na concentração de HE4 ou CA-125 (51). Todavia, o HE4 aumenta em pessoas com insuficiência cardíaca crónica de forma proporcional à sua severidade (33).

O consumo de tabaco, tal como em outros marcadores tumorais, é um fator que influencia diretamente os níveis de HE4, sendo estes 20-30% maiores nos fumadores comparativamente com os não fumadores. Assim, averiguar se a doente é fumadora,

ou não, é de extrema importância para uma avaliação correta destes dados. Vale a pena referir que, em oposição, o CA-125 não varia com o tabagismo (52).

Fator de variação	HE4	CA-125	Referência
Endometriose	—	↑	(40)
Adenomiiose	↑	↑	(40)
Idade	↑	—	(42)
Menopausa	↑	↑	(42)
Gravidez	—	↑	(8,33)
Ciclo menstrual	—	↑	(8,30)
Insuficiência renal	↑	—	(31,45,46)
Contraceptivos orais	↓	—	(48)
Diabetes	—	↓	(50)
HTA	—	↓	(50)
IMC	—	—	(51)
Insuficiência cardíaca	↑	—	(33)
Tabaco	↑	—	(52)

Tabela 2. Fatores de variação de HE4 e CA-125. HTA: hipertensão arterial; IMC: índice de massa corporal.

Papel do HE4 na oncogénese do cancro do ovário

Para além da sua utilidade como biomarcador tumoral, o HE4 tem uma extrema relevância na oncogénese desta neoplasia, através de uma diversa quantidade de mecanismos. Em primeiro lugar, tem um papel importante na proliferação celular e no crescimento tumoral. Vários estudos *in vitro* sugerem que o HE4 está implicado na regulação do ciclo celular das células neoplásicas. Um deles, demonstrou que o silenciamento do HE4 levava à paragem do ciclo celular destas células em G0/G1 da interfase, impedindo a passagem para a fase S. No entanto, ao serem estimuladas com HE4 recombinante verificava-se que progrediam em grande quantidade para G2/M (53). Concordantemente, Renquan Lu et al. (2012) demonstrou que o silenciamento do gene *HE4* conduzia à inibição da proliferação celular *in vitro* e *in vivo*, através da diminuição da fosforilação da via EGFR/MAPK. Pelo estudo com ratos *knockout* para HE4 verificou, ainda, que estes apresentavam um menor crescimento da neoplasia (30,54). O HE4 ativa ainda outras vias de sinalização, tais como a JAK/STAT3 e PI3K/AKT, que estão implicadas diretamente com os diversos mecanismos de oncogénese. Provou-se que a sua inibição levava à diminuição da ativação dessas mesmas vias, diminuído consequentemente a progressão tumoral (55). Outro estudo, verificou ainda que a diminuição da expressão do gene de HE4 levava à apoptose das células anómalas, devido ao aumento da atividade da caspase-3 e a expressão da caspase-3 clivada (55).

No que diz respeito à angiogénese, o HE4 está relacionado maioritariamente com duas substâncias, sendo elas o *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1 α) e o STAT3. Verificou-se que ao inibir o primeiro, que na presença de hipoxia estimula o Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e consequente a neovascularização tumoral, os níveis de HE4 diminuam consideravelmente, demonstrando que existe relação entre ambos (3). O STAT3, é ativado diretamente pela presença de HE4 levando à ativação de substâncias como a IL-8, que estimula igualmente a angiogénese (55).

Relativamente à metastização, o HE4 contribui diretamente para a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo em que as células sofrem um processo de transformação adquirindo um fenótipo de célula mesenquimatosa, mais indiferenciada, com maior capacidade de migração e invasão. Utilizando ratos *knockdown* para HE4 verificou-se que a expressão de proteínas relacionadas com a EMT, tais como a E-caderina, N-Caderina, *Snail*, e metaloproteinases 2 e 9, estava bastante diminuída (3). Além disto,

o HE4 regula a expressão de componentes de matriz extracelular tais como LAMC2 e LAMB3, contribuindo também para o processo metastático (56).

Por fim, o HE4 contribui para a imunossupressão relacionada com o crescimento tumoral, através principalmente da *Programmed Cell Death Ligand 1* (PD-L1), que é uma proteína co-inibidora da resposta imune. Um estudo recente demonstrou que o aumento da expressão do HE4 levava conseqüentemente ao aumento da expressão de PD-L1, tanto a nível das células neoplásicas, como também dos macrófagos, favorecendo a supressão do sistema imune (57).

O estudo de todas as eventuais funções biológicas do HE4 relacionadas com a oncogénese do CO, demonstra a possibilidade não só de utilizar esta proteína como alvo terapêutico (através, por exemplo, de anticorpos neutralizadores), mas também de identificar vários outros alvos relacionados com a formação da neoplasia, permitindo no futuro o desenvolvimento de novas terapêuticas dirigidas (3). Atualmente, já existem estudos que exploram este potencial terapêutico do HE4. Em 2022, Jianli et al. utilizaram nanocorpos anti-HE4 de modo a neutralizar a proteína em células neoplásicas. Verificou-se que ao utilizar estes anticorpos como terapêutica dirigida, o HE4 perdeu a sua função autócrina. Conseqüentemente as células neoplásicas perderam viabilidade, entrando em apoptose. Ao neutralizar o HE4, verificou-se a diminuição da expressão de BCL2 e o aumento de poly (*ADP-ribose*) polymerases (PARP) clivadas e p53, justificando a indução da morte celular. Adicionalmente, a utilização destes anticorpos melhorava a resposta ao tratamento sistémico com cisplatina, sendo potencialmente útil o uso conjunto de ambas as terapêuticas (58).

Papel do HE4 no rastreio e diagnóstico precoce de CO

Atualmente cerca de 75% dos CO são diagnosticados em estádios FIGO III-IV. Além das terapêuticas sistêmicas inovadoras, o diagnóstico precoce permitiria impactar a sobrevida global destas mulheres de forma significativa e, possivelmente, as taxas de cura. Para tal o diagnóstico deveria ser feito idealmente em estágio FIGO I ou, no limite, num estágio FIGO II precoce, o que requer a definição de um método de rastreio eficaz de base populacional (30).

Devido à baixa incidência do cancro do ovário, os objetivos mínimos projetados para um método de rastreio de CO em estádios precoces são uma sensibilidade maior que 75% e uma especificidade de pelo menos 99,6 %. Apenas com estes valores se poderia equilibrar o benefício do rastreio com o risco de poder avançar para procedimentos diagnósticos invasivos desnecessários (59). Até à data não foi possível atingir uma especificidade tão elevada com os métodos existentes, e, provavelmente, nunca será possível atingir esse valor utilizando cada biomarcador isoladamente (60).

Foi demonstrado previamente que o HE4 se encontra aumentado em cerca de 92% dos doentes com cancro do ovário, apresentando uma sensibilidade idêntica, mas especificidade superior ao CA-125, que como referido, é o atual biomarcador de eleição para esta doença (26). Estudos publicados verificaram que o HE4 pode alcançar uma sensibilidade de 67% e uma especificidade de 96% para a deteção de CO (21). Adicionalmente, numa meta-análise, o HE4 apresentou uma sensibilidade agrupada de 81% e uma especificidade de 91%, sendo superior ao CA-125 no diagnóstico da doença (61). Em estádios precoces, um estudo demonstrou que o HE4 apresentava uma sensibilidade agrupada de 64% e uma especificidade agrupada de 87%. No entanto, em estádios tardios, apresentou valores superiores de sensibilidade (89%), com uma especificidade idêntica (86%) (2).

Uma meta-análise de 2022 que incluiu 38 estudos com um total de 14745 doentes, demonstrou claramente a validade diagnóstica do HE4 sérico no CO. Verificou-se uma sensibilidade combinada aceitável de 0,79 e uma especificidade muito positiva de 0,92 para diagnóstico de neoplasia ovárica. Foi calculada a AUC (*Area under the curve*) da curva sROC (*Summary receiver operating characteristics*), que avalia o desempenho global do teste, obtendo-se o valor de 0,88, demonstrando a sua capacidade diagnóstica. Adicionalmente, para uma probabilidade pré teste de 60%, ter um valor de

HE4 aumentado eleva a probabilidade pós-teste de ter cancro do ovário para 94%, indicando um forte valor preditivo positivo. Para as doentes com níveis normais de HE4 a probabilidade pós teste diminui para 26%. Outro dado importante é o *Odds Ratio* obtido de 43, o que significa que uma mulher com HE4 aumentado tem 43 vezes mais probabilidades de ter cancro do ovário. Por fim verificou-se um *likelihood ratio* positivo de 9,7 e negativo de 0,23, demonstrando que um teste positivo está muito associado a presença de doença, e um teste negativo associado a uma boa capacidade de descartar doença. Apesar de tudo, esta meta-análise detetou alguma heterogeneidade nos resultados obtidos, cuja causa foi atribuída à etnicidade da população estudada. Os autores propõem a criação de *cut-off* diferentes para cada etnia, de modo a poder obter resultados mais fidedignos, constituindo este mais um fator a considerar na interpretação do HE4 (8). Outra meta-análise confirmou esta heterogeneidade entre etnias, adicionando que aparentemente o HE4 apresenta melhor precisão diagnóstica em mulheres asiáticas, comparativamente com todas as outras etnias. Verificou-se que mulheres desta etnia apresentavam melhor especificidade, mas ligeiramente menor sensibilidade que mulheres europeias e norte americanas (62).

Em comparação direta com o CA-125, o HE4 apresentou uma sensibilidade ligeiramente inferior, e uma especificidade e valor preditivo positivo (VPP) superiores. O elevado VPP do HE4 é uma grande vantagem, pois garante que existam poucos falsos positivos. Isto é de elevada relevância clínica pois as abordagens diagnósticas e terapêuticas em doente com suspeita elevada de CO são comumente invasivas. Assim, a existência de menos falsos positivos, leva a uma redução de procedimentos invasivos desnecessários, e consequentemente menos hospitalizações, menor comorbilidade e menores gastos (21).

A junção do HE4 ao CA-125 aumenta a sua capacidade diagnóstica, apresentando num estudo uma sensibilidade de 75,8%, especificidade de 93,5% e uma precisão diagnóstica de 85,7%, valores muito superiores comparativamente ao CA-125 de forma isolada (50). Adicionalmente, esta associação auxilia a interpretação correta dos valores de HE4 em mulheres fumadoras ou sob contraceptivos hormonais, pois os valores de CA-125 não sofrem alterações nestes casos (35).

Um estudo de 2020 analisou 177 biomarcadores no diagnóstico de neoplasias ováricas. O HE4 foi o biomarcador isolado que demonstrou maior capacidade no diagnóstico de neoplasias malignas do ovário, obtendo-se uma AUC da curva ROC de 0,830, valor que era superior comparativamente com os outros marcadores. Propôs-se, no entanto, um

modelo baseado na utilização conjunta do HE4 associado ao CA-125 e a um painel de biomarcadores circulantes constituído por proteínas associadas à carcinogénese (ITGAV, CXCL1, CEACAM1, IL-10RB), complementando-se ainda com a idade das doentes. Verificou-se que este era o método com melhor performance diagnóstica, com uma AUC da ROC de 0,868 (63).

No que diz respeito à idade, foi demonstrado que o HE4 é melhor biomarcador nas mulheres mais jovens (menos de 50 anos), comparativamente a mulheres mais velhas. Isto deve-se ao HE4 apresentar uma especificidade muito menor em mulheres de idade superior, maioritariamente devido ao aumento fisiológico que acontece com a idade. De modo a colmatar a diminuição da especificidade, verificou-se que ao utilizar pontos de corte ajustados para cada faixa etária este parâmetro melhorou consideravelmente, sendo por isso benéfico realizar este ajuste (41). Contrariamente, o CA 125 foi melhor nas mulheres com idade superior a 50 anos. Neste estudo verificou-se ainda que, em geral, o HE4 é superior no diagnóstico precoce da doença, sendo que a associação com o CA-125 aumentou muito a sensibilidade do teste, mas em contrapartida causou uma diminuição na especificidade, em especial nas mulheres com mais de 50 anos. Assim, esta associação de CA-125 e HE4 é particularmente útil nas mulheres jovens, onde apesar de comprometer alguma especificidade, a sensibilidade foi de 100%, permitindo detetar todos os casos de doença (41).

Em mulheres com massas pélvicas, um estudo demonstrou que o HE4 é superior ao CA-125 na distinção entre massas ováricas benignas e malignas, com uma especificidade de 0,84 *versus* 0,57, mas com sensibilidades equiparáveis (0,79 *versus* 0,81) (64). Suri et al. demonstrou em 2021 que o HE4 era o melhor biomarcador (comparando com CA-125 e o algoritmo ROMA) para diagnóstico da doença em mulheres pré-menopausa, com um *diagnostic odds ratio* de 41,03, uma especificidade de 0,90, e uma AUC de 0,91, valores superiores quando comparado com o grupo de mulheres pós-menopausa. Outro estudo acerca deste subgrupo de mulheres verificou que o HE4 apenas estava elevado em 2,3% de mulheres com massas benignas, enquanto o CA-125 estava elevado em 37,1%, demonstrando de novo a vantagem da elevada especificidade do HE4 como biomarcador tumoral (10,65). No entanto, Sun et al., ao comparar o valor do HE4 nas mulheres pré e pós-menopausicas, verificou que apresentavam sensibilidades e especificidades muito semelhantes entre os dois grupos, com maior precisão nas mulheres pós-menopausicas (62).

Recentemente foi reportado que o nível de HE4 entre doentes com mutação nos genes *BRCA1/2* é menor comparativamente com as que não apresentam mutação. Isto poderá dever-se ao facto de as doentes sem mutação apresentarem níveis superiores de doença microscópica, aumentando a carga tumoral total, e consequentemente os níveis do biomarcador. Para além disso, verificou-se que níveis aumentados de HE4 estão associados à presença de carcinomatose micronodular, mais preponderante em doentes sem mutação genética, conferindo pior prognóstico (66,67).

Foi também estudada a influência da infeção por Sars-CoV-2 nos níveis de HE4, e foi averiguado se o biomarcador continuava a ter a mesma utilidade em doentes infetadas. Verificou-se que o HE4 estava aumentado em 48% de pessoas infetadas/infeção recente sem cancro do ovário, no entanto o aumento era muito mais ténue (151-300 pmol/l), do que os valores detetados nas doentes oncológicos deste estudo (>600pmol/l). Dado isto, o *cut-off* proposto para distinguir doentes que efetivamente tenham cancro do ovário, de doentes que simplesmente estão infetadas por Sars-CoV-2, é de 328 pmol/L. Para além disso, não houve diferença significativa de níveis de HE4 em pessoas vacinadas e não vacinadas. Com isto, conclui-se que apesar da interferência da COVID 19 neste marcador, a sua utilidade e eficácia permanecem inalteradas. No entanto, é recomendado verificar se as doentes têm história de COVID-19 recente, de modo a interpretar o biomarcador corretamente (68).

Em mulheres com endometriomas (endometriose ovárica) e nas quais se suspeite simultaneamente de uma possível neoplasia, o HE4 pode ter um papel importantíssimo, principalmente quando a ecografia transvaginal é inconclusiva. Num estudo sobre esta temática, as doentes foram divididas em 3 grupos: um grupo apenas com neoplasia ovárica, outro com neoplasia ovárica e endometriomas, e outro apenas com endometriomas. O HE4 estava aumentado em todos os casos dos dois primeiros grupos, e encontrava-se normal no último. Isto não se verificou com o CA-125 que se encontrava aumentado em todos os grupos de doentes, demonstrando mais uma vez a sua baixa especificidade, contrastando com a do HE4 (69).

No que diz respeito a neoplasias não epiteliais o papel do HE4 é mais controverso. Um estudo com doentes com neoplasias não epiteliais, tanto benignas, como malignas, verificou que as doentes com patologia benigna apresentavam um valor médio destes biomarcadores idêntico ao da com patologia maligna. Por outro lado, verificou-se que os HE4 e CA-125 estavam aumentados significativamente em tumores malignos de células germinativas. O estudo do papel dos biomarcadores nestas neoplasias é de grande dificuldade devido à raridade das mesmas, no entanto, tendo em conta a

evidência atual, os biomarcadores parecem pouco úteis no diagnóstico de neoplasias não epiteliais (70). Desta forma verifica-se que a heterogeneidade do cancro do ovário, no que respeita às suas diversas formas histológicas, dificulta o desenvolvimento de biomarcadores universais para o rastreio destas neoplasias (3).

Esta dificuldade de diagnosticar de forma precoce o CO utilizando biomarcadores relaciona-se também com as baixas quantidades destes que são secretadas por tumores em estádios iniciais. No entanto, a sua libertação pode induzir uma resposta imune, levando à produção de anticorpos específicos para esses antigénios associados ao tumor. Estes anticorpos poderão ser detetados de forma ainda mais precoce que os próprios antigénios e constituir futuros biomarcadores do CO (71,72). Um estudo investigou o possível contributo do doseamento de anticorpos contra HE4 e de complexos antigénio-anticorpo de HE4 em utilização conjunta com o CA-125. Foi demonstrado que a AUC da curva ROC melhorou e foram detetadas mais 20% de neoplasias comparativamente com o seu uso isolado. Verificou-se que em estádios iniciais os complexos antigénio-anticorpo de HE4 eram os mais detetados, enquanto em estádios tardios os antigénios, isto é, o HE4, eram os mais frequentemente elevados. Isto deve-se, provavelmente, à imunossupressão associada às neoplasias avançadas e, também, ao ritmo acelerado de produção de HE4 em casos de alto *burden* tumoral. Estudos mais antigos também já tinham utilizado esta técnica para o CA-125 (73,74).

A utilização de biomarcadores, entre eles o CA-125 e o HE4, associados a exames de imagem, em especial com a ressonância magnética de contraste dinâmico (DCE-MRI), melhorava a capacidade diagnóstica em cancros do ovário avançados comparativamente com o uso desses recursos de forma isolada (75).

O doseamento do HE4 na urina também tem vindo a ser alvo de estudos, demonstrando poder constituir mais um recurso a ser utilizado no diagnóstico de CO. O doseamento urinário apresenta algumas vantagens comparativamente ao soro, tais como: a colheita indolor e que pode ser realizada em qualquer lugar de forma fácil; ter um proteoma mais simples comparativamente ao soro; a urina não ser tão influenciada pelos mecanismos homeostáticos como o sangue, sofrendo menos alterações na sua concentração (76). Uma meta-análise verificou que este doseamento apresentava uma sensibilidade agrupada de 0,80, especificidade agrupada de 0,93 e AUC da curva ROC de 0,94 (8). A combinação do doseamento urinário do HE4 e CA-125, onde bastava um ser positivo, apresentou uma sensibilidade superior à utilização separada. Apesar de ser necessária mais evidência científica acerca do doseamento urinário destes biomarcadores, esta

abordagem constitui uma possível estratégia *point-of-care* de rastreio não só em mulheres sintomáticas, mas também para mulheres assintomáticas em alto risco, por exemplo com mutação BRCA-2, indicando quais devem ser submetidas a um estudo mais aprofundado para uma possível neoplasia ovária (76).

Artigo	HE4			CA-125			ROMA			REF
	S(%)	E(%)	AUC	S (%)	E(%)	AUC	S(%)	E(%)	AUC	
Elena Braicu et al. (2022)	-	-	PM: 0,80 M: 0,82	-	-	PM: 0,80 M: 0,89	-	-	PM:0,81 M:0,86	(77)
Kyung Han et al. (2019)	PM: 28,3 M :40,7	PM:97,3 M: 95,4	PM: 0,78 M: 0,84	PM:54,3 M: 74,6	PM 73,7 M 91,6	PM:0,68 M: 0,88	PM: 50 M: 79,7	PM:85,8 M: 88,4	PM:0,731 M: 0,871	(78)
Hui-Jing Luo et al. (2023)	-	-	0,891	-	-	0,850	-	-	0,910	(79)
Khadijah Adebisi Shittu et al. (2023)	77,5	96,8	0,845	69,4	82,5	0,679	75,5	100	0,851	(80)
Neelam Nalini et al. (2022)	79 U: 80	92 U: 93	0,88 U: 0,94	-	-	-	-	-	-	(8)
Katarzyna M. Terlikowska et al. (2016)	67,1	97,5	0,895	81,9	74,1	0,879	86,2	86,8	0,918	(81)
Jinbing Huang et al. (2018)	81	91	0,91	-	-	-	-	-	-	(61)
Giuseppe Scaletta et al. (2017)	78	86	-	-	-	-	-	-	-	(2)
Alshymaa A Ahmed et al. (2019)	83,9	70,5	0,88	91,9	53,8	0,91	-	-	-	(50)
Rui Sun et al. (2022)	PM: 71 M: 91 T: 76	PM: 78 M: 90 T :95	T: 0,90	-	-	-	-	-	-	(62)
Chloe E. Barr et al. (2022)	90,2	75,6	0,927	80,5	92,2	0,927	87,8	80,8	0,959	(41)
Maria Olsen et al. (2021)	79,4	84,1	-	81,4	56,8	-	-	-	-	(64)
Arpita Suri et al. (2021)	73	90	0,91	84	73	0,86	PM: 80 M: 88 T: 86	PM:80 M: 83 T: 79	PM: 0,88 M: 0,94 T: 0,91	(10)
Ruchi S. Arora et al. (2022)	PM: 75 M: 38	PM: 65 M: 88	PM: 0,70 M: 0,66	PM: 83 M: 86	PM: 46 M: 66	PM: 0,69 M: 0,55	PM: 80 M: 81	PM: 64 M: 58	PM: 0,55 M: 0,59	(82)
Koray Aslan et al. (2020)	84,2	98,4	0,9	84,2	49,2	0,794	84,2	75,3	0,893	(83)
Chloe E. Barr et al. (2023)	U: 70,6	U: 58,8	U: 0,69	U: 64,7	U: 74,2	U: 0,71	-	-	-	(76)

Tabela 3. Desempenho diagnóstico de HE4, CA-125 e do algoritmo ROMA de acordo com os diversos estudos. Legenda - S: Sensibilidade; E: Especificidade; AUC: Area under the curve; REF: referências; PM: Mulheres em pré menopausa; M: Mulheres em menopausa; T: Todas as mulheres; U: Doseado na urina

Ao analisar a Tabela 3, verifica-se que grande parte dos estudos demonstram um elevado valor diagnóstico do HE4. No entanto, é evidente uma heterogeneidade nos valores apresentados nos diversos trabalhos. Esta heterogeneidade poderá dever-se a vários fatores, entre eles, a utilização de doentes em diferentes estádios de neoplasia ovárica, sobrestimando ou subestimando o valor do marcador, os diferentes tipos histológicos em estudo, a utilização de pontos de corte diferentes entre eles, a etnia das populações estudadas e, também, a utilização de métodos de deteção diferentes (62).

Papel do HE4 no prognóstico pré-operatório

Os biomarcadores para além de um papel importante no diagnóstico, são importantes também na definição do prognóstico da doença. Desta forma, através da interpretação de valores pré-operatórios, é possível estratificar doentes em níveis de risco no que diz respeito ao potencial sucesso terapêutico, permitindo prever o desenvolvimento da doença, avaliar a ressecabilidade da massa tumoral (e consequentemente o sucesso cirúrgico) e, ainda, a sensibilidade à terapêutica com sais de platina (22).

Uma área em que o HE4 pode ter bastante a utilidade é na seleção de doentes que são bons candidatos a cirurgia primária. Habitualmente, em 80% dos doentes submetidos a cirurgia primária, obtém-se uma resseção R0. No entanto, nos restante 20%, a escolha de realizar cirurgia primária não foi a correta, perdendo-se tempo, recursos, prejudicando o estado clínico, e consequentemente a sobrevivência de uma doente que teria recebido um tratamento otimizado se tivesse sido submetida a quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia de intervalo. Um estudo de 2022 estudou a utilidade do doseamento de HE4 neste contexto e verificou-se que o ponto de corte ideal, para a previsão de uma boa candidata a cirurgia, seria de 170 pmol/l, com um valor preditivo negativo de 81%. Isto na prática significa que em doentes com HE4 menor que 170 pmol/l a cirurgia primária é realizada com sucesso em cerca de 80% dos casos. Por outro lado, se o HE4 for superior a 170 pmol/l, a decisão terapêutica lógica é não realizar cirurgia primária, mas sim quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia de intervalo. Outros estudos realizados chegaram à mesma conclusão, variando os pontos de corte utilizados (84,85).

O valor de HE4 pré-operatório permite também prever com qualidade a sensibilidade aos sais de platina, apresentando uma AUC de 0,627, sendo melhor que o CA-125 que apresenta uma AUC de 0,547 (86). Outro estudo, demonstrou igualmente a capacidade de avaliar a sensibilidade à platina, comprovado por uma AUC de 0,644. Esta capacidade de prever a resposta ao tratamento sistémico é bastante útil, pois a resistência à quimioterapia condiciona um pior prognóstico. Mais de 25% dos doentes apresentam resistência primária aos sais de platina, levando a uma resposta sub-ótima, a uma progressão da doença durante o tratamento, ou uma recorrência precoce após tratamento (86). Nassir et al. demonstrou que valores altos de HE4 e CA-125 antes do tratamento estavam associados a uma pior resposta ao tratamento sistémico com derivados da platina (87). Para além disso, verificou-se que doseamentos de HE4

previamente à cirurgia, superiores a 500 pmol/L estavam significativamente associados a uma diminuição da sobrevida aos 5 anos, com redução de 59% para 29% (7).

Um estudo realizado por Daniela Furrer et al. em 2019, demonstrou que o HE4 pré-operatório apresentava uma boa capacidade para identificar mulheres com alto risco de morte. Foi definido o *cut-off* de 277 pmol/L, acima do qual as mulheres apresentavam um maior risco de morte. Verificou-se, no entanto, que esta associação era mais forte em mulheres com carcinoma do subtipo seroso, aumentando a capacidade preditiva dos fatores prognósticos pré-operatórios utilizados rotineiramente na prática clínica (idade, estágio FIGO, tipo histológico, grau do tumor). O mesmo não se verificava nos outros subtipos, em que, ajustando para esses outros fatores de prognóstico, a utilidade do HE4 era somente marginal (88). Um estudo com 48 doentes tratadas com cirurgia primária de citorredução, demonstrou uma correlação significativa entre a sobrevida global (SG) e livre de progressão (SLP) e os valores de HE4 pré-operatórios (86).

Demonstrou-se também que os níveis pré-operatórios de HE4 permitem distinguir doentes com elevada carga tumoral dos com uma carga tumoral mais reduzida, com elevada significância estatística ($p < 0,0001$). Os autores destes estudos demonstraram assim que doentes com HE4 aumentado apresentam maior carga tumoral na cirurgia, mas também objetivada por PET/CT (*Positron Emission Tomography - Computed Tomography*) pré-operatória (25,89). No que diz respeito a metastização, verificou-se que valores de HE4 superiores a 472 pmol/l estão associadas a maior probabilidade de já existir envolvimento ganglionar no pré-operatório (84).

HE4 na monitorização do tratamento do cancro do ovário

A monitorização da terapêutica instituída é de grande importância, especialmente em doentes sob quimioterapia neoadjuvante, de modo a poder inferir acerca sucesso do tratamento (19). Tradicionalmente o CA-125 é o biomarcador mais usado para este propósito, no entanto, o HE4 cada vez mais apresenta um papel importante na monitorização destas doentes (19).

Como previamente exposto, o sucesso terapêutico depende de uma cirurgia sem tumor residual macroscópico (R0) e de uma adequada resposta à quimioterapia com sais de platina. Visto que o HE4 neste contexto é secretado por células ováricas malignas e do microambiente tumoral, uma remoção eficaz do tumor, bem como uma resposta positiva ao tratamento sistémico, estará associada a uma diminuição dos níveis de HE4 (90). Um estudo de 2018 demonstrou que para além dos valores pré-operatórios de HE4, a normalização ou não dos mesmo no fim de todo o tratamento está diretamente relacionado com a SLP e com a SG. Demonstrou ainda que a diminuição de 50 % do valor em doentes com tratamento neoadjuvante para cirurgia de intervalo estava associado a um forte poder prognóstico, verificando-se nestes casos de sucesso terapêutico, o aumento tanto da SLP como da SG. Estes dados mostram a importância dos doseamentos não só numa fase inicial, mas também de forma seriada durante o tratamento sistémico (86).

Rong et al. em 2021, estudaram a relação entre a *clearance* de HE4 e do CA-125 em doentes sob quimioterapia adjuvante, com a sensibilidade à platina, a SLP aos 2 anos, a SLP durante todo o tempo de seguimento, e a sobrevida global (SG). A *clearance* foi considerada como a diminuição da concentração de base dos marcadores em mais de 90% ou a sua normalização. Verificou-se que a *clearance* do HE4 a partir do terceiro ciclo de quimioterapia, e a *clearance* do CA-125 a partir do primeiro ciclo de quimioterapia apresentavam a maior associação estatisticamente significativa com a SLP e a SG, apresentando, então, elevado valor prognóstico na monitorização terapêutica (90).

No que diz respeito à avaliação da sensibilidade à platina o estudo provou que a *clearance* do HE4 após o terceiro ciclo era estatisticamente superior à *clearance* do CA-125 após primeiro ciclo, mas inferior à associação de ambos os marcadores. Esta associação apresentava uma sensibilidade de 100%, permitindo assim que 100% dos doentes com cancro do ovário que não apresentassem *clearance* de HE4 no terceiro

ciclo e de CA-125 no primeiro ciclo, fossem classificados como resistentes à platina. Dado isto é recomendável fazer o doseamento destes marcadores durante o tratamento de quimioterapia adjuvante. Apesar de tudo, ainda não existem estudos que comprovem que alterar a estratégia terapêutica em doentes com fraca diminuição dos biomarcadores serológicos (classificados como resistentes à platina) traga benefício nos resultados clínicos das doentes (90). Um estudo verificou que o valor mínimo de HE4 em doentes que desenvolvem resistência à platina é significativamente elevado. Para além disso, doentes com um valor mínimo mais elevado (neste estudo HE4 superior a 56,58pmol/l) estavam associados a menor tempo livre de platina, ou seja, a um menor tempo entre a última dose de tratamento sistémico à base de platina e o aparecimento da recorrência (25).

Em 2020, Potenza et al. tentou identificar, através do doseamento de HE4 e CA-125, a capacidade de estes avaliarem a resposta à terapêutica sistémica e também a possível recorrência durante a mesma, em 78 doentes após cirurgia primária ou cirurgia de intervalo. Estes doseamentos foram realizados à data do diagnóstico e após cada ciclo de quimioterapia. Através da realização de TC (tomografia computadorizada), verificou-se que a totalidade dos doentes com boa resposta à quimioterapia, apresentavam uma normalização dos valores de HE4 e de CA-125 após o quarto ciclo de terapêutica sistémica, sendo que diminuição do HE4 durante o tratamento foi mais rápida que o CA-125. Em pacientes com má resposta ao tratamento, a deteção de um aumento nos marcadores é mais precoce no HE4. Apesar de uma melhor performance do HE4, os autores recomendam o doseamento de ambos os marcadores na monitorização terapêutica destes doentes (91).

Comparando com o CA-125, um estudo de 2022, demonstrou que o HE4 era equivalente a este na monitorização das doentes. O estudo recomenda que seja feita a monitorização da doença com o biomarcador que esteja mais elevado à data do diagnóstico na doente em específico. Em casos em que ambos apenas estão ligeiramente elevados, o doseamento e interpretação de ambos os marcadores é a estratégia mais eficaz (19).

Foi provado também que a combinação de HE4, com CA-125 e imagens obtidas por TC é a abordagem mais eficaz para prever a presença de tumor residual após quimioterapia (60). Para além disso, outro estudo verificou que doentes com tumor residual após cirurgia apresentavam o HE4 elevado, sendo significativamente alto em casos com tumor residual de tamanho maior que 10mm (92).

Um trabalho investigou a influência do HE4 na resistência à quimioterapia, utilizando clones de células neoplásicas, chegou a várias conclusões. Verificou-se que em linhagens celulares que possuem já elevada resistência à quimioterapia por outros mecanismos, como é o caso da linhagem OVCAR, o HE4 tinha um impacto mínimo. No entanto, noutra linhagem denominada por SKOV3, a expressão aumentada de HE4 influenciava mecanismos apoptóticos, aumentando a resistência à terapêutica sistêmica. Para além disso verificou-se que, diminuindo a transcrição do gene do HE4 utilizando a técnica de CRISPR/Cas, foi possível diminuir a resistência à quimioterapia nessas células. Ainda neste estudo, verificou-se uma grande variedade de mecanismos através dos quais o HE4 promove a resistência à terapêutica. Entre eles destacam-se a desregulação da via de sinalização MAPK, que é ativada de forma constitutiva, promovendo a sobrevivência das células neoplásicas e a resistência terapêutica. Adicionalmente, refere-se que a sobre-expressão de HE4 afeta a organização e as dinâmicas da tubulina, levando a uma possível desestabilização dos microtúbulos, e consequente diminuição da eficácia de alguns quimioterápicos, como o paclitaxel. Clinicamente, estes dados são importantes pois demonstram, uma vez mais, a necessidade da determinação dos níveis plasmáticos de HE4 durante o tratamento com quimioterapia de modo a prever a resistência à mesma. Para além disso, o uso de técnicas como o CRISPR/CAS para inibir a transcrição de HE4, poderá ser muito útil no futuro de modo a aumentar a eficácia do tratamento sistêmico, ao diminuir a resistência aos agentes de quimioterapia (93).

Papel do HE4 na recorrência

O uso de biomarcadores para detecção precoce de recorrências, antes de qualquer tipo de sintoma, é de grande importância, pois nesta doença, mesmo em casos de sucesso terapêutico, isto é cirurgia R0, existe recorrência em 25% dos doentes com estádios precoces e em 80% com estádios avançados (30). Devido a esta grande probabilidade de recorrência, e mau prognóstico que isso acarreta, torna-se imperativo o desenvolvimento de biomarcadores que a detetem precocemente e permitam uma atuação terapêutica atempada (22).

Atualmente o CA-125 é o biomarcador mais utilizado neste âmbito, tendo sido demonstrado previamente que este pode aumentar até 4,8 meses antes do aparecimento de uma recorrência clínica (94). O CA-125 isoladamente, com um ponto de corte de 35 U/ml, apresenta uma sensibilidade de 63,39% e uma especificidade 86,79% de na detecção precoce de recorrências (22). Da mesma forma, existem estudos que tentam demonstrar a aplicabilidade do doseamento de HE4 com o mesmo intuito, comparando-o várias vezes com o biomarcador de referência, o CA-125. A evidência acumulada aponta para o HE4 como um indicador mais precoce da detecção de recorrência do cancro do ovário, comparativamente com o CA-125, apresentando uma maior sensibilidade e especificidade para a mesma (2,86).

Num trabalho de Chudecka-Głaz et al. foram estudados 188 doentes com cancro do ovário e verificou-se que as doentes com valores mais elevados de HE4 ao diagnóstico, após cirurgia, e após quimioterapia, tinham um maior risco de recorrência ao longo do tempo (92). No que diz respeito a pontos de corte, Furrer et al. demonstrou que doentes, à data do diagnóstico, com valores de HE4 maiores que 277 p/mol e CA-125 maiores que 282 IU/ml, para além de apresentarem maior risco de morte, apresentavam risco aumentado para recorrência de cancro do ovário (88). Outro estudo verificou que todos os doentes que estavam vivos 3 anos após a primeira recorrência da doença tinham um HE4 inferior a 199,20 pmol/l no momento da detecção da mesma. Isto permitiu concluir que o valor do HE4 aquando da detecção da primeira recorrência da doença está fortemente associado ($p=0,002$) à sobrevivência das mulheres (25).

Num estudo com 8 mulheres seguidas durante 20 meses após cirurgia de citorredução primária, 5 dessas tiveram um aumento significativo nas concentrações de HE4 e CA-125. Este aumento era preditivo de recorrência da doença. Neste estudo, o aumento do

HE4 foi 5 a 8 meses mais precoce que o de CA-125 (95). Outro trabalho chegou a conclusões semelhantes, no que respeita a elevação mais precoce do HE4 em caso de recorrência, sendo especialmente útil em doentes com neoplasias que não expressam CA-125 ao diagnóstico (96). O HE4 apresentava também uma variação maior em casos de recorrência (76%), comparativamente com o CA-125, que apresentava um aumento de apenas 40% (97). Laskhsamann et al. demonstrou que o doseamento de HE4 no soro apresentava uma sensibilidade equivalente ao CA-125 (85,3% vs 84,3%) mas uma especificidade maior (91,4% vs 70,2%) na deteção de recorrência da doença, com um aumento do marcador 3 meses mais precoce, comparativamente ao CA-125 neste contexto (98). Todavia, tal como em outras fases da doença, a melhor abordagem na deteção da recorrência precoce parece ser a análise conjunta de biomarcadores séricos com a combinação do CA-125 e HE4, o que permite aumentar a capacidade preditiva face ao uso dos marcadores de forma isolada (19).

Outra estratégia de combinação de técnicas para a deteção não só de recorrências, mas também de metástases de cancro do ovário, é a utilização simultânea da PET/FDG com o CA-125 e o HE4, com sensibilidade e especificidade de 100%. Neste estudo, foi também possível evidenciar uma correlação estatística entre o valor máximo de captação na PET e os níveis de HE4, demonstrando mais uma vez a utilidade do biomarcador no diagnóstico de recorrências e metástases, mas também a sua relação com a atividade das células de CO (99).

Utilização conjunta do HE4 com CA-125 e algoritmos diagnósticos

Apesar de, como já foi discutido, o HE4 ter utilidade no cancro do ovário de forma isolada, também ficou evidente que a sua associação ao CA-125 parece melhorar a sua capacidade preditiva. Adicionalmente, este biomarcador pode ser utilizado em algoritmos multifatoriais, criados de para otimizar a aplicação dos biomarcadores

Um dos primeiros algoritmos a ser criado foi o *Risk of Malignancy Index* (RMI), proposto em 1990 por Jacobs et al. (100) que associa o CA-125, o estado de menopausa e dados ecográficos. Foi demonstrado previamente que um RMI maior que 200 estava associado a um alto risco de diagnóstico de cancro do ovário, com uma sensibilidade de 85,4% e uma especificidade de 96,9% (35). Vários estudos sugeriram alterações ao algoritmo, o que trouxe melhorias discretas à capacidade do teste, como por exemplo o aumento do ponto de corte para 250, que permitiu um aumento ligeiro da especificidade, ou até a inclusão do tamanho da massa (maior diâmetro em centímetros) na fórmula (35). Outro algoritmo mais recente é o *Risk of Malignancy Algorithm* (ROMA) desenvolvido em 2009 por Moore et al. que associa o HE4, o CA 125 e o estado de menopausa, permitindo categorizar mulheres com uma massa pélvica como de alto risco ou de baixo risco para cancro do ovário (101). As fórmulas de ambos os algoritmos encontram-se explanadas na figura 2.

Fórmula para cálculo do RMI

$$\text{RMI} = U \times M \times [\text{CA125}]$$

Fórmula para cálculo do ROMA

Pré menopausa: $\text{IP} = -12.0 + 2.38 \times \text{LN} [\text{HE4}] + 0.0626 \times \text{LN} [\text{CA125}]$

Pós-menopausa: $\text{IP} = -8.09 + 1.04 \times \text{LN} [\text{HE4}] + 0.732 \times \text{LN} [\text{CA125}]$

Valor ROMA (%) = $e^{\text{IP}} / [1 + e^{\text{IP}}] \times 100\%$

Figura 2: Fórmulas para o cálculo do RMI e ROMA. Legenda: U - *ultrasound score* (U=0 se *score*=0; U=1 se *score*=1; U=3 se *score*=2 a 5); M - estado de menopausa (Pré-menopausa=1; Pós-menopausa=3). IP - Índice preditivo LN - logaritmo natural e - base do logaritmo natural.

No que diz respeito ao ROMA, aplicando o *cut-off* sugerido pelos autores, sempre tendo em conta a possível existência de algumas variações dependendo do método de testagem, mulheres pré-menopausa com score superior a 13,1% e pós-menopausa com score superior a 27,7% são consideradas como de alto risco para cancro do ovário. Estes mesmos autores demonstraram uma sensibilidade média de 93,8%, sendo que as mulheres em pré e pós-menopausa apresentavam sensibilidades diferentes no diagnóstico de CO, de 88,9% e 94,6%, respetivamente (101). Adicionalmente, foi demonstrado previamente que o ROMA era mais eficaz que o uso dos biomarcadores isolados no contexto de estratificação de risco de malignidade pré-operatório (102). No entanto, dois estudos demonstraram que o algoritmo ROMA não só era superado, como também não acrescentava informação na caracterização da massa ovárica, quando comparado com uma avaliação ecográfica subjetiva da doente, ou seja, não utilizando o *ultrasound score* (103,104).

Um estudo propôs uma modificação ao algoritmo ROMA, denominada por ROMA P, que ao contrário do original utiliza a idade do doente e não o estado de menopausa. Esta alteração justifica-se pela variabilidade regular que o HE4 apresenta com o aumento da idade da doente. Esta modificação apresentou uma maior especificidade e um maior valor preditivo positivo que o original, mas, no entanto, a sensibilidade e o valor preditivo negativo eram menores. No que diz respeito à AUC esta era muito similar (0,934 para o ROMA e 0,923 para o ROMA P) (105). Karlsen et al. Em 2015, sob o nome de *Copenhagen Index* (CPH-I), propôs basicamente o mesmo algoritmo, verificando-se que o uso da idade, não só era mais simples e intuitivo que o uso do estado de menopausa, como também apresentava uma AUC ligeiramente superior ao ROMA convencional (106).

Quando comparado com o RMI, o algoritmo ROMA apresentou, no geral, maior sensibilidade no diagnóstico de cancro do ovário, algo que era ainda mais significativo quando se tratava de cancros em estádios precoces (FIGO I/II) (33). Vale a pena referir que, como o algoritmo ROMA não tem em conta qualquer tipo de dados ecográficos, ao contrário do RMI, este torna-se de maior importância em locais onde o acesso à ecografia é limitado (82). Já foram efetuados estudos no sentido de avaliar se a efetividade do RMI com a utilização do HE4, em vez do CA-125, melhoraria a capacidade discriminativa do teste. No entanto, não foram detetadas melhorias estatisticamente significativas (33).

Vários estudos efetuaram comparações entre os vários biomarcadores e índices existentes no contexto da doença, de modo a averiguar qual era o método mais fiável para a possível identificação de massas malignas. Um trabalho realizado em 2022 por Arora et al. comparou o poder de diagnóstico de neoplasia do ovário em doentes com uma massa pélvica entre o CA-125, o HE-4, o ROMA e o RMI. O ROMA apresentou uma precisão diagnóstica superior aos outros classificando corretamente 69,5% das massas pélvicas, enquanto o HE4 e o CA-125 isolados apenas identificaram 66,5% e 54,5%, respetivamente (82).

Um estudo de 2022 investigou a precisão diagnóstica do HE4 isoladamente, em conjunto com o CA-125 ou incluído no algoritmo ROMA, numa população de mulheres sintomáticas em contexto de cuidados de saúde primários. Em geral, o algoritmo ROMA, que neste estudo se aplicou utilizando a idade (mais ou menos de 50 anos), apresentou a maior performance diagnóstica com uma AUC de 0,96, revelando-se melhor que os outros biomarcadores isolados. Em mulheres com menos de 50 anos, a combinação do HE4 e do CA-125, em que bastava um estar aumentado para indicar malignidade, foi o método superior, apresentando uma sensibilidade de 100% (diagnosticou todos os casos). Nas mulheres com mais de 50 anos, a combinação do HE4 com o CA-125 apesar de elevar a sensibilidade comparativamente com os marcadores isolados, levou a uma grande diminuição da especificidade. Assim, nesta faixa etária, o algoritmo ROMA voltou a ser o melhor método diagnóstico, com uma sensibilidade 84,4% e uma especificidade de 87,2% (41).

Estratificando as mulheres por estado hormonal, verificou-se que nas pré-menopausa o HE4 e ROMA tinham maior especificidade que o CA-125 e RMI para o diagnóstico do CO, no entanto eram menos sensíveis que estes últimos. Assim, neste grupo, caso uma mulher apresente um ROMA e HE4 baixo, muito provavelmente terá uma massa será benigna. No pós-menopausa, neste estudo, o HE4 apresentou a maior especificidade de todos (88%), e o CA-125 a maior sensibilidade (86%), sendo a sensibilidade do ROMA equiparável a este marcador. O estudo refere que mulheres na menopausa, com um ROMA alto e elevação do CA-125 têm quase garantidamente uma massa pélvica maligna (82). Para este mesmo grupo de mulheres (pós-menopausa), Arpita Suri et al. em 2021, demonstrou que o ROMA tinha a maior capacidade diagnóstica comparado com o HE4 e CA-125, com um *diagnostic odds ratios* de 44,04, uma sensibilidade de 0,88 e uma AUC de 0,94, comparativamente com um *diagnostic odds ratios* de 41,03, uma sensibilidade de 0,73 e uma AUC de 0,91 para o HE4 (10). O CA-125 é

particularmente preciso neste grupo de mulheres, demonstrando em alguns estudos ser superior ao ROMA (78).

Um estudo verificou que utilizar pontos de corte de HE4 e ROMA superiores aos utilizados por rotina, aumentava consideravelmente o VPP e VPN de ambos os métodos, melhorando a precisão diagnóstica. Ao aumentar os pontos de corte do ROMA houve, nas mulheres mais jovens, uma diminuição da proporção de falsos positivos de 33% para 5,2%, e de 12,7% para 5,8% nas mais velhas. Neste estudo o algoritmo ROMA superou o HE4 tanto em mulheres pré como pós-menopausa (102).

No que diz respeito à detecção precoce de recorrências, o ROMA mostrou-se também superior ao uso do HE4 e CA-125 de forma isolada, apresentando uma sensibilidade de 90,59% para um *cut-off* de 17,07%. Valores de Roma superiores a 34,71% estavam ainda associados a uma menor sobrevivência livre de recorrência (107).

Apesar de tudo isto, a evidência não é clara no que diz respeito a qual a melhor abordagem diagnóstica. Contrariamente a alguns estudos já referidos, em que o ROMA era a abordagem mais precisa, um estudo realizado por Aslan et. al demonstrou que o HE4 era a melhor estratégia para auxílio no diagnóstico de cancro do ovário. Este biomarcador, quando comparado com o ROMA, CA-125 e com ecografia (*ultrasound score*), apresentava a melhor AUC (curva ROC), sensibilidade, especificidade, VPP e VPN. Todos os métodos apresentavam especificidades altas (75%-98%), com exceção do CA-125, que tinha uma especificidade menor (49,2%). As sensibilidades eram em equiparáveis entre eles. Apesar de tudo, o estudo demonstra que qualquer uma das quatro abordagens pode ser utilizada com eficácia, pois todas apresentam AUC relativamente altas (CA-125: 0,794; HE4: 0,900; Ecografia: 0,794; ROMA: 0,893), propondo ainda que se beneficia bastante de uma abordagem integrada utilizando os diversos métodos apresentados (83).

Foi estudado também um modelo utilizando de forma conjunta o CA-125 e o HE4, associados ao nível de estradiol (E2), para o diagnóstico precoce de cancro do ovário em mulheres pós-menopausa. O estradiol em mulheres com neoplasia ovárica apresenta-se bastante diminuído comparativamente com mulheres com massas pélvicas benignas. Este modelo mostrou-se melhor comparativamente com o uso isolado dos biomarcadores, sendo calculada uma AUC de 0,97, superior a AUC calculada para o HE4, que foi de 0,88. A inclusão neste modelo de diagnóstico do

doseamento de progesterona, que tal como estradiol está associada à carcinogénese do CO, não se mostrou vantajosa (108–110).

O CEA, um biomarcador comumente utilizado em outras neoplasias como o cancro colorretal, pode ser utilizado em conjunto com o HE4. Um estudo utilizando *machine learning*, em que foram investigadas, de entre 48 variáveis, quais as mais úteis no diagnóstico de CO, verificou que esta combinação de biomarcadores era eficiente. O CEA é particularmente útil em casos em que o HE4 não se encontra elevado, pois mulheres com massa pélvica com HE4 normal, mas CEA aumentado, têm uma probabilidade elevada de ter uma massa maligna. A AUC desta associação foi ligeiramente superior ao algoritmo ROMA, com a vantagem acrescida de ser uma forma mais intuitivo e simples de estratificação de risco para o uso clínico quotidiano (111,112).

Conclusão

O cancro do ovário é a neoplasia ginecológica mais mortal atualmente (1). Grande parte desta mortalidade deve-se à ausência de estratégias eficazes no diagnóstico precoce, prognóstico, monitorização e seguimento destas doentes (13). Os biomarcadores séricos constituem uma opção bastante válida de colmatar estes problemas, sendo atualmente mais utilizado o CA-125, que apesar de recomendado pelas diversas sociedades de oncologia, apresenta algumas fragilidades, tais como o seu aumento numa grande variedade de situações, benignas ou malignas, levando a uma especificidade aquém do necessário (23). Assim, esta revisão teve como objetivo a exposição da informação disponível acerca da utilidade da utilização do HE4 como biomarcador tumoral no cancro do ovário.

O HE4 é uma glicoproteína que para além de estar presente em vários tecidos normais, é produzida e libertada pelas células tumorais e respetivo microambiente tumoral, podendo posteriormente ser doseada no soro (27,28). Atualmente não existe nenhum método standardizado de doseamento do marcador, como também não existem pontos de corte bem definidos para cada um dos propósitos da sua utilização (35).

O HE4, através da interferência num grande número de vias de sinalização celular, tem também um papel importante na oncogénese tumoral. Contribui para proliferação celular, crescimento tumoral, inibição da apoptose e promoção da angiogénese, bem como para a modulação da resposta imune e metastização (53,55,56,113). Este conhecimento poderá permitir o desenvolvimento de novas estratégias de terapêutica dirigida, seja através da inibição direta do HE4, ou da transcrição do seu gene, constituindo uma utilização promissora do HE4 para melhorar o *outcome* das doentes (58).

As concentrações de HE4 aumentam bastante com a idade, sendo este aumento mais acentuado na pós-menopausa (39). Outros fatores que influenciam as concentrações do HE4 são o declínio função renal, tabagismo, utilização de contraceptivos hormonais, entre outros (31,45,46,52). Assim, uma história clínica completa é indispensável, de modo a interpretar os valores de HE4 consoante estas condições. No entanto, contrariamente ao CA-125, este permanece maioritariamente inalterado na presença de patologia ginecológica benigna, como endometriose, na gravidez e diversas fases do

ciclo menstrual, tornando-o útil para a distinção entre massas benignas e malignas, e também para a avaliação de mulheres em idade fértil (40).

A descoberta de novas estratégias que contribuam para o diagnóstico precoce de CO é uma das melhores opções para diminuir a mortalidade da doença (30). Apesar de ainda não existir nenhum teste que apresente os valores mínimos necessários para um teste de rastreio eficaz, o HE4 apresenta bastante potencial na detecção desta neoplasia (59). Este apresenta sensibilidade alta, mas muitas das vezes idêntica ou menor, comparativamente ao CA-125. No entanto, é a sua especificidade bastante elevada, e consideravelmente superior à do CA-125, que o destaca, conferindo-lhe grande valor na distinção de patologia benigna da maligna (26,61). No que diz respeito ao desempenho do HE4 consoante o estado de menopausa, a evidência não é clara, variando bastante o subgrupo de mulheres em que o HE4 é mais eficiente consoante os estudos (62). No entanto, tende a sê-lo mais nas mulheres mais jovens, devido à diminuição da especificidade com a idade, consequência do aumento fisiológico do HE4 com a mesma. Para colmatar isto basta a criação de pontos de corte específicos para cada faixa etária, mas também adaptada à etnia das doentes. O CA-125 tem maior capacidade diagnóstica nas mulheres pós-menopausa (41). O contributo do HE4 no diagnóstico aplica-se principalmente a neoplasias epiteliais, visto que a sua capacidade diagnóstica nas neoplasias não-epiteliais é bastante fraca (70).

É promissor também o doseamento do HE4 na urina. No entanto, apesar de apresentar resultados muito positivos nos estudos já realizados, é necessária mais evidência para provar o real valor deste recurso (8,76).

O HE4 é útil também no prognóstico pré-operatório permitindo a estratificação das doentes em níveis de risco, ajudando a prever o seu desfecho clínico (22). O seu doseamento pré-cirúrgico permite ainda auxiliar com qualidade a decisão terapêutica, na questão entre submeter uma doente a cirurgia primária, ou a tratamento neoadjuvante seguido de cirurgia de intervalo, com impacto direto no *outcome* da doente (84,85). A sensibilidade ao tratamento sistémico com sais de platina e consequente sucesso da terapêutica é igualmente avaliada através da análise das concentrações do biomarcador (86). O HE4 como preditor prognóstico é particularmente útil no subtipo seroso de CO (88).

Outra utilidade importante do HE4, é o seu contributo na monitorização do tratamento instituído, podendo-se através do seu doseamento inferir acerca do sucesso terapêutico. Verifica-se que a normalização do biomarcador no fim de todo o tratamento

e a redução de 50% no final do tratamento neoadjuvante, associa-se a maior sobrevida (SLP e SG) (86). Em geral, valores mais elevados, ou ausência de diminuição de HE4, estarão associados a uma resistência ao tratamento sistêmico, com falência do mesmo, e impacto direto na sobrevida dos doentes (90,91). Comparativamente ao CA-125, estes são basicamente equivalentes neste propósito, sendo recomendável o uso dos dois em conjunto (19).

Um dos principais problemas do CO é a alta percentagem de recorrências, mesmo em doentes com aparente sucesso terapêutico (30). O HE4 contribui para a deteção destas, mesmo antes do aparecimento de manifestações clínicas, permitindo uma abordagem terapêutica precoce. Em caso de recorrência, o HE4 eleva-se mais precocemente e em maior quantidade, comparativamente com o CA-125 (86). No entanto, a sua utilização conjunta parece ser a opção mais vantajosa. O valor de HE4 aquando do diagnóstico também parece estar relacionado com um maior risco de vir a desenvolver recorrência (88).

O HE4 apesar de ser útil de forma isolada, verifica-se benéfica a sua associação ao CA-125. Adicionalmente, foram criados algoritmos de risco como o RMI e ROMA, que indicam se uma mulher com massa pélvica apresenta maior ou menor risco de ter CO. O algoritmo ROMA, através da combinação do HE4, CA-125 e estado de menopausa (por vezes, inclusive a idade), dá-nos um valor em percentagem do risco de o doente ter patologia maligna (101). Este é atualmente mais utilizado que o RMI, principalmente por ser mais sensível para estádios precoces e dispensar a realização de ecografia (33). Apesar do ROMA em grande parte dos estudos comparativos se apresentar como a abordagem com melhor performance diagnóstica, particularmente nas mulheres pós-menopausa, a evidência não é clara, indicando por vezes que é mais vantajoso utilizar o HE4 de forma isolada (41,82,83). A abordagem mais vantajosa será optar por uma interpretação integrada dos vários biomarcadores e algoritmos, de modo a tirar conclusões o mais fidedignas possível (83).

São necessários mais estudos para definir pontos de corte diferentes para cada objetivo do doseamento, e que sejam dependentes do estado hormonal, idade e etnia. É ainda prioritário definir um único método uniforme e preciso de doseamento de HE4 para melhor uma avaliação universal e estandardizada deste marcador. Deve-se também investir no desenvolvimento de mais testes *point of care*, que permita um doseamento rápido e fácil à cabeceira do doente. Adicionalmente, o desenvolvimento de terapêuticas dirigidas ao HE4, poderá constituir no futuro um poderoso recurso no tratamento desta

neoplasia. Assim, o HE4 mostra-se um potencial alvo terapêutico, diagnóstico e prognóstico, com potencial de alterar a prática clínica e a sobrevivência das doentes com cancro do ovário.

Referências bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. Maio de 2021;71(3):209–49.
2. Scaletta G, Plotti F, Luvero D, Capriglione S, Montera R, Miranda A, et al. The role of novel biomarker HE4 in the diagnosis, prognosis and follow-up of ovarian cancer: a systematic review. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2 de Setembro de 2017;17(9):827–39.
3. Anastasi E, Farina A, Granato T, Colaiacovo F, Pucci B, Tartaglione S, et al. Recent Insight about HE4 Role in Ovarian Cancer Oncogenesis. *Int J Mol Sci*. 1 de Julho de 2023;24(13).
4. Huang X, Wang X, Shang J, Lin Y, Yang Y, Song Y, et al. Association between dietary fiber intake and risk of ovarian cancer: a meta-analysis of observational studies. *J Int Med Res*. 1 de Outubro de 2018;46(10):3995–4005.
5. Ovarian cancer risk | Cancer Research UK. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/ovarian-cancer/risk-factors>
6. Pathology Outlines - WHO classification. Disponível em: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/ovarytumorwhoclassif.html>
7. Matsas A, Stefanoudakis D, Troupis T, Kontzoglou K, Eleftheriades M, Christopoulos P, et al. Tumor Markers and Their Diagnostic Significance in Ovarian Cancer. *Life* 2023, Vol 13, Page 1689. 5 de Agosto de 2023;13(8):1689.
8. Nalini N, Kumar A, Sharma S, Singh B, Singh A V, Prakash J, et al. The Diagnostic Accuracy of Serum and Urine Human Epididymis Protein 4 (HE4) in Ovarian Cancer in 15,394 Subjects: An Updated Meta-Analysis. *Cureus*. 19 de Outubro de 2022 14(10).
9. Jacobs IJ, Menon U, Ryan A, Gentry-Maharaj A, Burnell M, Kalsi JK, et al. Ovarian cancer screening and mortality in the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 5 de Março de 2016;387(10022):945–56.
10. Suri A, Perumal V, Ammalli P, Suryan V, Bansal SK. Diagnostic measures comparison for ovarian malignancy risk in Epithelial ovarian cancer patients: a meta-analysis. *Sci Rep*. 1 de Dezembro de 2021;11(1).
11. Jayson GC, Kohn EC, Kitchener HC, Ledermann JA. Ovarian cancer. *The Lancet* . 11 de Outubro de 2014;384(9951):1376–88.

12. Campbell S, Gentry-Maharaj A. The role of transvaginal ultrasound in screening for ovarian cancer. *Climacteric*. 4 de Maio de 2018;21(3):221–6.
13. Colombo N, Sessa C, Bois A du, Ledermann J, McCluggage WG, McNeish I, et al. ESMO–ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease†. *Annals of Oncology* . 1 de Maio de 2019; 30(5):672–705.
14. Zhang R, Siu MKY, Ngan HYS, Chan KKL. Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci*. 1 de Outubro de 2022;23(19).
15. Redondo A, Guerra E, Manso L, Martin-Lorente C, Martinez-Garcia J, Perez-Fidalgo JA, et al. SEOM clinical guideline in ovarian cancer (2020). *Clinical and Translational Oncology*. 1 de Maio de 2021; 23(5):961–8.
16. González-Martín A, Harter P, Leary A, Lorusso D, Miller RE, Pothuri , et al. Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up 5 behalf of the ESMO Guidelines Committee. 2023
17. Hinchcliff E, Westin SN, Herzog TJ. State of the science: Contemporary front-line treatment of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1 de Julho de 2022; 166(1):18–24.
18. Bartoletti M, Musacchio L, Giannone G, Tuninetti V, Bergamini A, Scambia G, et al. Emerging molecular alterations leading to histology-specific targeted therapies in ovarian cancer beyond PARP inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 1 de Dezembro de 2021;
19. Samborski A, Miller MC, Blackman A, Maclaughlan-David S, Jackson A, Lambert-Messerlian G, et al. HE4 and CA125 serum biomarker monitoring in women with epithelial ovarian cancer. *Tumor Biology*. 24 de Setembro de 2022;44(1):205–13.
20. Andreas Papadopoulos, Omer Devaja. *Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment*.
21. Li J, Dowdy S, Tipton T, Podratz K, Lu WG, Xie X, et al. HE4 as a biomarker for ovarian and endometrial cancer management. *Expert Rev Mol Diagn* . Setembro de 2009; 9(6):555–66.
22. Giampaolino P, Foreste V, Corte L Della, Di Filippo C, Iorio G, Bifulco G. Role of biomarkers for early detection of ovarian cancer recurrence. *Gland Surg*. 1 de Agosto de 2020 9(4):1102.
23. El Bairi K, Afqir S, Amrani M. Is HE4 Superior over CA-125 in the Follow-up of Patients with Epithelial Ovarian Cancer? *Curr Drug Targets*. 26 de Abril de 2020;21(10):1026–33.

24. Elorriaga MÁ, Neyro JL, Mieza J, Cristóbal I, Llueca A. Biomarkers in Ovarian Pathology: From Screening to Diagnosis. Review of the Literature. *Journal of Personalized Medicine* 2021, Vol 11, Page 1115. 29 de Outubro de 2021;11(11):1115.
25. Salminen L, Gidwani K, Grønman S, Carpén O, Hietanen S, Pettersson K, et al. HE4 in the evaluation of tumor load and prognostic stratification of high grade serous ovarian carcinoma. *Acta Oncol (Madr)*. 1 de Dezembro de 2020;59(12):1461–8.
26. Qing X, Liu L, Mao X. A Clinical Diagnostic Value Analysis of Serum CA125, CA199, and HE4 in Women with Early Ovarian Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Comput Math Methods Med*. 2022;2022.
27. Hellström I, Raycraft J HLM, Ledbetter JA, Schummer M, McIntosh M DC, Urban N, et al. The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2003 Jul 1.
28. James NE, Chichester C, Ribeiro JR. Beyond the Biomarker: Understanding the Diverse Roles of Human Epididymis Protein 4 in the Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer. *Front Oncol* . 24 de Abril de 2018 ;8(APR).
29. Behrouzi R, Barr CE, Crosbie EJ. HE4 as a Biomarker for Endometrial Cancer. *Cancers (Basel)*. 1 de Outubro de 2021; 13(19).
30. Ferraro S, Panteghini M. Making new biomarkers a reality: The case of serum human epididymis protein 4. *Clin Chem Lab Med* . 1 de Setembro de 2019;57(9):1284–94.
31. Maksimiuk M, Budzik MP, Deptała A, Badowska-Kozakiewicz AM. HE4 – not only an ovarian cancer biomarker – a brief review. *Nowotwory* . 31 de Outubro de 2019;69(3–4):142–5.
32. Rowswell-Turner RB, Singh RK, Urh A, Yano N, Kim KK, Khazan N, et al. HE4 Overexpression by Ovarian Cancer Promotes a Suppressive Tumor Immune Microenvironment and Enhanced Tumor and Macrophage PD-L1 Expression. *The Journal of Immunology*. 15 de Maio de 2021;206(10):2478–88.
33. Janas Ł. Current clinical application of serum biomarkers to detect and monitor ovarian cancer – update. *Prz Menopauzalny*. 2021;20(4):211. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8764959/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34812345/)
34. Ferraro S, Borille S, Carnevale A, Frusciante E, Bassani N, Panteghini M. Verification of the harmonization of human epididymis protein 4 assays. *Clin Chem Lab Med* . 1 de Outubro de 2016 ;54(10):1635–43.

35. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.* 27 de Março de 2019;12(1).
36. Bilgi Kamaç M, Altun M, Yılmaz M, Yılmaz Aktan A, Aktan S, Sezgintürk MK. Point-of-care testing: a disposable label-free electrochemical CA125 and HE4 immunosensors for early detection of ovarian cancer. *Biomed Microdevices.* 1 de Junho de 2023;25(2).
37. Gubala V, Harris LF, Ricco AJ, Tan MX, Williams DE. Point of care diagnostics: Status and future. *Anal Chem.* 17 de Janeiro de 2012;84(2):487–515.
38. Samadi Pakchin P, Fathi M, Ghanbari H, Saber R, Omid Y. A novel electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of CA125 in ovarian cancer. *Biosens Bioelectron.* 1 de Abril de 2020; 153:112029.
39. Lycke M, Ulfenborg B, Malchau Lauesgaard J, Kristjansdottir B, Sundfeldt K. Consideration should be given to smoking, endometriosis, renal function (eGFR) and age when interpreting CA125 and HE4 in ovarian tumor diagnostics. *Clin Chem Lab Med.* 1 de Novembro de 2021;59(12):1954–62.
40. Kim B, Park Y, Kim B, Ahn HJ, Lee K, Chung JE, et al. Diagnostic performance of CA125, HE-4, and risk of Ovarian Malignancy Algorithm for ovarian cancer. *J Clin Lab Anal.* 15 de Janeiro de 2019;33(1).
41. Barr CE, Funston G, Jeevan D, Sundar S, Mounce LTA, Crosbie EJ. The Performance of HE4 Alone and in Combination with CA125 for the Detection of Ovarian Cancer in an Enriched Primary Care Population. *Cancers (Basel).* 1 de Maio de 2022; 14(9):2124.
42. Cheng HY, Zeng L, Ye X, Ma RQ, Tang ZJ, Chu HL, et al. Age and menopausal status are important factors influencing the serum human epididymis secretory protein 4 level: A prospective cross-sectional study in healthy Chinese people. *Chin Med J (Engl).* 5 de Junho de 2020;133(11):1285–91.
43. Hu X, Zhang J, Cao Y. Factors associated with serum CA125 level in women without ovarian cancer in the United States: a population-based study. *BMC Cancer.* 1 de Dezembro de 2022; 22(1):1–14.
44. Moore RG, Michael; Miller C, Eklund EE, Lu KH, Bast RC, et al. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206:349–50.
45. Ferraro S, Pasqualetti S, Carnevale A, Panteghini M. Cystatin C provides a better estimate of the effect of glomerular filtration rate on serum human epididymis protein 4 concentrations. *Clin Chem Lab Med.* 1 de Outubro de 2016; 54(10):1629–34.

46. Yan S, Lin Y, Tian X. Significantly elevated serum human epididymis protein-4 in chronic kidney disease patients without ovarian cancer: A large-scale retrospective study. *J Clin Lab Anal.* 1 de Abril de 2023;37(4).
47. Chovanec J, Selingerova I, Greplova K, Antonsen SL, Nalezinska M, Høgdall C, et al. Adjustment of serum HE4 to reduced glomerular filtration and its use in biomarker-based prediction of deep myometrial invasion in endometrial cancer. *Oncotarget.* 12 de Dezembro de 2017; 8(64):108213.
48. Ferraro S, Schiumarini D, Panteghini M. Human epididymis protein 4: factors of variation. *Clin Chim Acta.* 27 de Agosto de 2015; 438:171–7.
49. Hallamaa M, Suvitie P, Huhtinen K, Matomäki J, Poutanen M, Perheentupa A. Serum HE4 concentration is not dependent on menstrual cycle or hormonal treatment among endometriosis patients and healthy premenopausal women. *Gynecol Oncol.* Junho de 2012; 125(3):667–72.
50. Ahmed AA, Abdou AM. Diagnostic accuracy of CA125 and HE4 in ovarian carcinoma patients and the effect of confounders on their serum levels. *Curr Probl Cancer.* 1 de Outubro de 2019;43(5):450–60.
51. Ferraro S, Borille S, Caruso S, Boggio A, Muzio F, Rizzi A, et al. Body mass index does not influence human epididymis protein 4 concentrations in serum. *Clin Chim Acta.* 5 de Junho de 2015; 446:163–4.
52. Cramer DW, Vitonis AF, Sasamoto N, Yamamoto H, Fichorova RN. Epidemiologic and biologic correlates of serum HE4 and CA125 in women from the National Health and Nutritional Survey (NHANES). *Gynecol Oncol.* 1 de Abril de 2021;161(1):282–90.
53. Promotive role of recombinant HE4 protein in proliferation and carboplatin resistance in ovarian cancer cells.
54. Lu R, Sun X, Xiao R, Zhou L, Gao X, Guo L. Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 de Março de 2012;419(2):274–80.
55. Wang A, Jin C, Tian X, Wang Y, Li H. Knockdown of HE4 suppresses aggressive cell growth and malignant progression of ovarian cancer by inhibiting the JAK/STAT3 pathway. *Biol Open.* 15 de Setembro de 2019;8(9).
56. Ribeiro JR, Gaudet HM, Khan M, Schorl C, James NE, Oliver MT, et al. Human epididymis protein 4 promotes events associated with metastatic ovarian cancer via regulation of the extracellular matrix. *Front Oncol.* 22 de Janeiro de 2018;7(JAN).
57. Rowswell-Turner RB, Singh RK, Urh A, Yano N, Kim KK, Khazan N, et al. HE4 Overexpression by Ovarian Cancer Promotes a Suppressive Tumor Immune

- Microenvironment and Enhanced Tumor and Macrophage PD-L1 Expression. *The Journal of Immunology*. 15 de Maio de 2021; 206(10):2478–88.
58. Yu J, Guo Y, Gu Y, Li F, Song H, Nian R, et al. Targeting and neutralizing human epididymis protein 4 by novel nanobodies to suppress ovarian cancer cells and attenuate cisplatin resistance. *Int J Biol Macromol*. 28 de Fevereiro de 2022; 199:298–306.
 59. Mathis J, Jellouli MA, Sabiani L, Fest J, Blache G, Mathevet P. Ovarian cancer screening in the general population. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 1 de Setembro de 2019; 41(3).
 60. Chakraborty S, Shenoy PS, Mehrotra M, Phadte P, Singh P, Rekhi B, et al. Through the Looking Glass: Updated Insights on Ovarian Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 1 de Fevereiro de 2023;13(4).
 61. Huang J, Chen J, Huang Q. Diagnostic value of HE4 in ovarian cancer: A meta-analysis. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*. 1 de Dezembro de 2018; 231:35–42.
 62. Sun R, Liu L, Feng Z, Ni A, Guo Q. Diagnostic accuracy of serum human epididymis protein 4 in ovarian cancer patients with different ethnic groups and menopausal status: a meta-analysis and systematic evaluation. *Ginekol Pol*. 27 de Outubro de 2022.
 63. Leandersson P, Åkesson A, Hedenfalk I, Malander S, Borgfeldt C. A multiplex biomarker assay improves the diagnostic performance of HE4 and CA125 in ovarian tumor patients. *PLoS One*. 1 de Outubro de 2020;15(10 October).
 64. Olsen M, Lof P, Stiekema A, van den Broek D, Wilthagen EA, Bossuyt PM, et al. The diagnostic accuracy of human epididymis protein 4 (HE4) for discriminating between benign and malignant pelvic masses: a systematic review and meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1 de Outubro de 2021;100(10):1788–99.
 65. Huang X, Wang Y, He X, Kang F, Luo L, Su Z, et al. Comparison between serum HE4 and CA125 as tumor markers in premenopausal women with benign pelvic mass. *Clin Lab*. 2019;65(5):717–24.
 66. Plotti F, Terranova C, Guzzo F, Nardone CDC, Luvero D, Bartolone M, et al. Role of BRCA Mutation and HE4 in Predicting Chemotherapy Response in Ovarian Cancer: A Retrospective Pilot Study. *Biomedicine*. 1 de Janeiro de 2021; 9(1):1–12.
 67. Manganaro L, Celli V, Viggiani V, Berardelli E, Granato T, Tartaglione S, et al. CT imaging phenotypes linked to CA125 and HE4 biomarkers are highly predictive in discriminating between hereditary and sporadic ovarian cancer patients. *Tumor Biology*. 1 de Janeiro de 2022;44(1):171–85.

68. Farina A, Colaiacovo F, Gianfrate M, Pucci B, Angeloni A, Anastasi E. Ovarian Cancer Biomarkers in the COVID-19 Era. *Int J Environ Res Public Health* . 29 de Maio de 2023; 20(11).
69. Rius M, Fusté P, Ros C, Martínez-Zamora Á, deGuirior C, Gracia M, et al. HE4 might be a more useful tumor biomarker to detect malignancy in patients with ovarian endometrioma when malignancy is suspected. *Journal of International Medical Research*. 2021;49(9).
70. Gomes TA, Campos EA, Yoshida A, Sarian LO, Andrade LALDA, Derchain SF. Preoperative Differentiation of Benign and Malignant Non-epithelial Ovarian Tumors: Clinical Features and Tumor Markers. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*. 1 de Setembro de 2020;42(9):555–61.
71. Shi JX, Qin JJ, Ye H, Wang P, Wang KJ, Zhang JY. Tumor associated antigens or anti-TAA autoantibodies as biomarkers in the diagnosis of ovarian cancer: a systematic review with meta-analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 1 de Junho de 2015 ;15(6):829–52.
72. Fortner RT, Damms-Machado A, Kaaks R. Systematic review: Tumor-associated antigen autoantibodies and ovarian cancer early detection. *Gynecol Oncol*. 1 de Novembro de 2017; 147(2):465–80.
73. Yang WL, Lu Z, Guo J, Fellman BM, Ning J, Lu KH, et al. Human epididymis protein 4 antigen-autoantibody complexes complement cancer antigen 125 for detecting early-stage ovarian cancer. *Cancer*. 15 de Fevereiro de 2020; 126(4):725–36.
74. Gourevitch MM, Von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov S V., Kenemans P, Van Kamp GJ, Verstraeten AA, et al. Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br J Cancer*. 1995; 72(4):934–8.
75. Wang Q, Dong H, Zhou P. Application Value of Combined Detection of DCE-MRI and Serum Tumor Markers HE4, Ki67, and HK10 in the Diagnosis of Ovarian Cancer. *Contrast Media Mol Imaging*. 2022;2022.
76. Barr CE, Njoku K, Owens GL, Crosbie EJ. Urine CA125 and HE4 for the Detection of Ovarian Cancer in Symptomatic Women. *Cancers (Basel)*. 1 de Fevereiro de 2023; 15(4).
77. Braicu EI, Krause CL, Torsten U, Mecke H, Richter R, Hellmeyer L, et al. HE4 as a serum biomarker for the diagnosis of pelvic masses: a prospective, multicenter study in 965 patients. *BMC Cancer*. 1 de Dezembro de 2022; 22(1):1–11.

78. Han KH, Park NH, Kim JJ, Kim S, Kim HS, Lee M, et al. The power of the risk of ovarian malignancy algorithm considering menopausal status: A comparison with CA 125 and HE4. *J Gynecol Oncol*. 1 de Novembro de 2019;30(6).
79. Luo HJ, Hu ZD, Cui M, Zhang XF, Tian WY, Ma CQ, et al. Diagnostic performance of CA125, HE4, ROMA, and CPH-I in identifying primary ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 1 de Março de 2023;49(3):998–1006.
80. Shittu KA, Rabiou KA, Akinola OI, Ahmed SB, Adewunmi AA. Comparison of the diagnostic accuracy of HE4 with CA125 and validation of the ROMA index in differentiating malignant and benign epithelial ovarian tumours among patients in Lagos, Nigeria. *Ecancermedicalscience*. 2023;17.
81. Terlikowska KM, Dobrzycka B, Witkowska AM, Mackowiak-Matejczyk B, Sledziewski TK, Kinalski M, et al. Preoperative HE4, CA125 and ROMA in the differential diagnosis of benign and malignant adnexal masses. *J Ovarian Res*. 19 de Julho de 2016;9(1):1–7.
82. Arora RS, Patel SM, V. A, Vemanamandhi P. Diagnostic accuracy of HE4 and risk of ovarian malignancy algorithm in prediction of ovarian cancer in patients with pelvic mass: a regional cancer centre experience. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 27 de Abril de 2022;11(5):1531–8.
83. Aslan K, Onan MA, Yilmaz C, Bukan N, Erdem M. Comparison of HE 4, CA 125, ROMA score and ultrasound score in the differential diagnosis of ovarian masses. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 1 de Maio de 2020;49(5).
84. Saffarieh E, Nassiri S, Mirmohammadkhani M. Predicting value of HE4 and CA125 markers for optimal cytoreductive surgery in ovarian cancer patients. *Eur J Transl Myol*. 9 de Setembro de 2022; 32(3):2022.
85. Feng LY, Liao S Bin, Li L. Preoperative serum levels of HE4 and CA125 predict primary optimal cytoreduction in advanced epithelial ovarian cancer: A preliminary model study. *J Ovarian Res*. 12 de Fevereiro de 2020;13(1).
86. Chudecka-Głaz A, Cymbaluk-Płoska A, Węsaowska M, Menkiszak J. Could HE4 level measurements during first-line chemotherapy predict response to treatment among ovarian cancer patients? *PLoS On*. 1 de Março de 2018; 13(3): e0194270.
87. Nassir M, Guan J, Luketina H, Siepmann T, Rohr I, Richter R, et al. The role of HE4 for prediction of recurrence in epithelial ovarian cancer patients-results from the OVCAD study. *Tumour Biol*. 1 de Março de 2016; 37(3):3009–16.
88. Furrer D, Grégoire J, Turcotte S, Plante M, Bachvarov D, Trudel D, et al. Performance of preoperative plasma tumor markers HE4 and CA125 in predicting ovarian cancer mortality in women with epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 1 de Junho de 2019; 14(6).

89. Glickman A, Paredes P, Carreras-Diéguez N, Niñerola-Baizán A, Gaba L, Pahisa J, et al. Evaluation of patients with advanced epithelial ovarian cancer before primary treatment: correlation between tumour burden assessed by [18F] FDG PET/CT volumetric parameters and tumour markers HE4 and CA125. *Eur Radiol*. 1 de Abril de 2022;32(4):2200–8.
90. Rong Y, Li L. Early clearance of serum HE4 and CA125 in predicting platinum sensitivity and prognosis in epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 1 de Dezembro de 2021;14(1).
91. Potenza E, Parpinel G, Laudani ME, Macchi C, Fuso L, Zola P. Prognostic and predictive value of combined HE-4 and CA-125 biomarkers during chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer. *International Journal of Biological Markers*. 30 de Outubro de 2020; 35(4):20–7.
92. Chudecka-Głaz A, Strojna A, Michalczyk K, Wieder-Huszla S, Safranow K, Skwirczyńska E, et al. Evaluation of He4 Use in the Diagnosis of Ovarian Cancer: First and Second Recurrence, and an Analysis of HE4 Concentration during Second- and Third-Line Chemotherapy. *Diagnostics 2023*, Vol 13, Page 452. 26 de Janeiro de 2023;13(3):452
93. Ribeiro JR, Schorl C, Yano N, Romano N, Kim KK, Singh RK, et al. HE4 promotes collateral resistance to cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*. 17 de Maio de 2016; 9(1):1–18.
94. Yang WL, Lu Z, Bast RC. The role of biomarkers in the management of epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 3 de Junho de 2017; 17(6):577–91.
95. Anastasi E, Giovanna Marchei G, Viggiani V, Gennarini G, Frati L, Reale MG. HE4: a new potential early biomarker for the recurrence of ovarian cancer. *Tumour Biol*. 2010; 31(2):113–9.
96. Plotti F, Guzzo F, Schirò T, Terranova C, De Cicco Nardone C, Montera R, et al. Role of human epididymis protein 4 (HE4) in detecting recurrence in CA125 negative ovarian cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*. 1 de Maio de 2019; 29(4):768–71.
97. Abbink K, Zusterzeel PLM, Geurts-Moespot AJ, Herwaarden AE van, Pijnenborg JMA, Sweep FCGJ, et al. HE4 is superior to CA125 in the detection of recurrent disease in high-risk endometrial cancer patients. *Tumour Biol*. 1 de Fevereiro de 2018; 40(2).
98. Lakshmanan M, Kumar V, Chaturvedi A, Misra S, Gupta S, Akhtar N, et al. Role of serum HE4 as a prognostic marker in carcinoma of the ovary. *Indian J Cancer*. 1 de Julho de 2019;56(3):216–21.

99. Sun J, Cui XW, Li YS, Wang SY, Yin Q, Wang XN, et al. The value of 18F-FDG PET/CT imaging combined with detection of CA125 and HE4 in the diagnosis of recurrence and metastasis of ovarian cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24(13):7276–83.
100. JACOBS I, ORAM D, FAIRBANKS J, TURNER J, FROST C, GRUDZINSKAS JG. A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer. *Br J Obstet Gynaecol.* 1990;97(10):922–9.
101. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, DiSilvestro P, Miller MC, Allard WJ, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* Janeiro de 2009; 112(1):40–6.
102. Špacir Prskalo Z, Bulić P, Langer S, Gaće M, Puljiz M, Danolić D, et al. Proofs for implementation of higher HE4 and ROMA index cut-off values in ovarian cancer preoperative stratification. *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 17 de Fevereiro de 2019;39(2):195–201.
103. Van Gorp T, Veldman J, Van Calster B, Cadron I, Leunen K, Amant F, et al. Subjective assessment by ultrasound is superior to the risk of malignancy index (RMI) or the risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) in discriminating benign from malignant adnexal masses. *Eur J Cancer.* Julho de 2012; 48(11):1649–56.
104. Kaijser J, Van Gorp T, Smet ME, Van Holsbeke C, Sayasneh A, Epstein E, et al. Are serum HE4 or ROMA scores useful to experienced examiners for improving characterization of adnexal masses after transvaginal ultrasonography? *Ultrasound Obstet Gynecol.* Janeiro de 2014; 43(1):89–97.
105. Chudecka-Głaz A, Cymbaluk-Płoska A, Jastrzębska J, Menkiszak J. Can ROMA algorithm stratify ovarian tumor patients better when being based on specific age ranges instead of the premenopausal and postmenopausal status? *Tumour Biol.* 1 de Julho de 2016; 37(7):8879–87
106. Karlsen MA, Høgdall EVS, Christensen IJ, Borgfeldt C, Kalapotharakos G, Zdrzilova-Dubska L, et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol.* 1 de Setembro de 2015; 138(3):640–6.
107. Li R, Ma S, Zu Y, Wang F, Gao T, Yang Y, et al. Value of the risk of ovarian malignancy algorithm index in predicting the recurrence of epithelial ovarian cancer. *Biomark Med.* 5 de Setembro de 2022;16(14):1055–66.

108. Romero IL, Lee W, Mitra AK, Gordon IO, Zhao Y, Leonhardt P, et al. The effects of 17 β -estradiol and a selective estrogen receptor modulator, bazedoxifene, on ovarian carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* Janeiro de 2012;124(1):134–41.
109. Laviolette LA, Hodgkinson KM, Minhas N, Perez-Iratxeta C, Vanderhyden BC. 17 β -estradiol upregulates GREB1 and accelerates ovarian tumor progression in vivo. *Int J Cancer.* 1 de Setembro de 2014;135(5):1072–84.
110. Zhang P, Wang C, Cheng L, Zhang P, Guo L, Liu W, et al. Development of a multi-marker model combining HE4, CA125, progesterone, and estradiol for distinguishing benign from malignant pelvic masses in postmenopausal women. *Tumour Biol.* 1 de Fevereiro de 2016; 37(2):2183–91.
111. Lu M, Fan Z, Xu B, Chen L, Zheng X, Li J, et al. Using machine learning to predict ovarian cancer. *Int J Med Inform.* 1 de Setembro de 2020;141.
112. Zhang F, Zhang Z long. The Diagnostic Value of Transvaginal Sonograph (TVS), Color Doppler, and Serum Tumor Marker CA125, CEA, and AFP in Ovarian Cancer. *Cell Biochem Biophys.* 15 de Junho de 2015; 72(2):353–7.
113. Lee S, Choi S, Lee Y, Chung D, Hong S, Park N. Role of human epididymis protein 4 in chemoresistance and prognosis of epithelial ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research.* 1 de Janeiro de 2017;43(1):220–7.